



**Departamento de Genética
Universidad de Sevilla**

**Nuevos mecanismos moleculares de regulación de la
carotenogénesis en *Fusarium oxysporum***

**Trabajo presentado para optar al
Grado de Doctor en Biología por la Licenciada
Obdulia Parra Rivero**

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Ávalos Cordero y la Dra.
María del Carmen Limón Mirón en el Departamento de Genética de la Facultad de
Biología de la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2018

**Dr. Francisco Javier
Ávalos Cordero**

**Dra. María del
Carmen Limón Mirón**

Obdulia Parra Rivero

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	7
Género <i>Fusarium</i>	7
<i>Fusarium oxysporum</i>	7
Carotenoides.....	9
Naturaleza química de los carotenoides	9
Funciones de los carotenoides.....	9
Funciones de los carotenoides en los animales y las plantas	9
Función de los carotenoides en los hongos	11
Síntesis de los carotenoides en los hongos	11
Síntesis de los carotenoides en <i>Fusarium</i>	14
Genes de la ruta de carotenogénesis en <i>Fusarium</i>	14
Regulación de la carotenogénesis.....	17
Regulación por luz.....	17
Regulación mediada por el gen <i>carS</i>	20
Regulación por factores independientes de la luz y el gen <i>carS</i>	23
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	31
Material.....	31
Material Biológico	31
Estirpe de <i>Escherichia coli</i>	31
Estirpe de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Vectores de clonación y plásmidos	32
Medios de cultivo.....	33
Medio de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	33
Medio de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
Medios de cultivo para <i>Fusarium oxysporum</i>	34
Métodos	34
Crecimiento y mantenimiento de microorganismos.....	34
Condiciones de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	34
Condiciones de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
Condiciones de cultivo para <i>Fusarium oxysporum</i>	35
Aislamiento de ácidos nucleicos.	36
Purificación de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	36
Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
Extracción de ADN de <i>Fusarium oxysporum</i>	37
Extracción de ARN de <i>Fusarium oxysporum</i>	37
Manipulación de ácidos nucleicos.....	38
Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	38
Recuperación de fragmentos de ADN en geles de agarosa	38
Tratamientos enzimáticos de ácidos nucleicos.....	39
Cuantificación de ácidos nucleicos	39
Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	39
Precipitación de ADN	43
Hibridación de ácidos nucleicos.....	43
Transformación genética	46
Transformación de <i>Escherichia coli</i>	46

Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
Transformación de <i>Fusarium oxysporum</i>	47
Inmunoprecipitación de cromatina.....	51
Extracción de cromatina e inmunoprecipitación.....	51
Determinación de los niveles de las marcas epigenéticas.....	53
Bioinformática.....	54
Análisis y tratamiento de secuencias.....	54
Tratamiento de los datos de RNA-Seq.....	54
RESULTADOS	61
Capítulo I. ANÁLISIS FUNCIONAL DE DOS POSIBLES GENES PARA PRECURSORES	
DE microARN.....	61
Introducción	61
Resultados	65
Producción de carotenoides en las estirpes superproductoras	65
Transcripción de los presuntos genes de precursores de microARN <i>fox-mir-1</i> y <i>fox-mir2</i>	65
Capítulo II. EFECTO DE LA LUZ Y LA MUTACIÓN DEL GEN <i>carS</i> SOBRE EL	
TRANSCRIPTOMA DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>.....	77
Introducción	77
Resultados	78
Efecto de la mutación <i>carS</i> y la luz sobre el transcriptoma de <i>F. oxysporum</i>	78
Capítulo III. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>carP</i>	103
Introducción	103
Resultados	104
Caracterización del transcrito del gen <i>carP</i>	104
Orientación del gen <i>carP</i>	106
Deleción del gen <i>carP</i>	109
Capítulo IV. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>carF</i>.....	117
Introducción	117
Resultados	118
Caracterización del gen <i>carF</i> (<i>Foxg_09306</i>) de <i>Fusarium oxysporum</i>	118
Expresión del gen <i>carF</i>	119
Deleción del gen <i>carF</i>	121
Capítulo V. REGULACIÓN DEL <i>CLUSTER car</i> A NIVEL DE CROMATINA	129
Introducción	129
Resultados	131
Análisis epigenético sobre los genes estructurales de la carotenogénesis	131
Marcas de activación y represión en los genes <i>carRA</i> y <i>carB</i>	132
DISCUSIÓN	141
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA.....	161
 ANEXOS	

Introducción

INTRODUCCIÓN

Género *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende un amplio y heterogéneo grupo de ascomicetos que pertenecen a la clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Nectriaceae. Se encuentra extensamente distribuido en la naturaleza e incluye numerosas especies, la mayoría son patógenas de vegetales capaces de causar marchitez vascular en numerosos cultivos y de producir toxinas que son letales para los animales (Moss y Smith, 1984). También incluye especies no patógenas, saprófitas y parásitas de otros organismos entre lo que se incluyen los humanos inmunodeprimidos (Ortoneda et al, 2004; Vartivarian et al, 1993).

Fusarium fue definido como género por Link en 1809 (Booth, 1971), el cual reúne a numerosos hongos imperfectos caracterizados por la producción de conidios sin septo y fusiformes. La clasificación del género *Fusarium* en especies se ha visto dificultada históricamente por la ausencia de ciclo sexual y la escasez de rasgos morfológicos fácilmente observables. Aunque la mayoría de las especies presentan sólo reproducción asexual, existen excepciones.

Fusarium oxysporum

Fusarium oxysporum se describe como un patógeno de plantas, con hifas septadas y sin ciclo sexual conocido (estado teleomórfico o peritecial), capaz de parasitar a más de 120 cultivos diferentes, además de infectar a personas inmunodeprimidas (Pietro et al., 2003). Se trata de un patógeno del suelo, utilizado como modelo de experimentación para estudiar el proceso de infección sobre plantas y el mecanismo de virulencia en mamíferos inmunodeprimidos.

F. oxysporum constituye por sí mismo un extenso complejo de estirpes y variedades patógenas de gran diversidad de plantas. Su caracterización morfológica se basa en la forma de los macroconidios y la formación de clamidosporas (Beckman, 1987).

Los aislados de patógenos de plantas de *F. oxysporum* producen marchitez vascular en una especie vegetal determinada y se han clasificado como *forma specialis* basándose en las especies hospedadoras (Armstrong y Armstrong, 1981). Se han descrito más de 120 *formae speciales* diferentes (Hawksworth et al., 1995). La especie objeto de estudio de esta Tesis es la *forma specialis Lycopersici*, que es patógena del tomate (*Lycopersicon esculentum*).

F. oxysporum carece de ciclo sexual conocido. La fusión de hifas vegetativas y la formación de heterocariontes entre los individuos se ha sugerido como una forma de transferencia horizontal de genes entre los distintas estirpes, que se restringe, generalmente, a las cepas compatibles y con genotipos similares (Kistler, 1997).

Debido a la predominancia de su reproducción asexual, *F. oxysporum* es generalmente considerado como un “complejo de especies”, es decir, un conjunto de líneas clonales dentro del género *Fusarium* aisladas genéticamente. Como tal, constituye un grupo similar al complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*, que alberga especies sexuales con teleomorfos de *Gibberella*, como *Fusarium verticillioides* y *Fusarium fujikuroi* (Guadet et al., 1989).

F. oxysporum presenta una textura algodonosa con una coloración que varía desde el rosa pálido al púrpura oscuro dependiendo de las condiciones de cultivo. La velocidad de crecimiento, el tamaño, la forma e incluso la cantidad de conidios que produce o el número de septos de sus hifas son variables (Booth, 1971). Los conidios de *F. oxysporum* pueden ser de tres tipos. Los macroconidios representan los más típicos del género, aunque son los menos abundantes. Son septados, con un número de células que oscilan entre tres y cinco, puntiagudos e inclinados hacia los extremos en forma de media luna. Los microconidios, con una o dos células, son los más abundantes y presentan formas ovaladas y cilíndricas. Por último las clamidosporas, formadas por una o dos células, son esféricas y al tener la pared engrosada son las más resistentes (Agrios, 1997) (Figura 1). Este hongo se encuentra prácticamente en todos los ecosistemas terrestres. Su vía de propagación en los cultivos es principalmente a distancias cortas, a través de la irrigación o por el uso de equipos contaminados. Sin embargo, puede propagarse a largas distancias a través del transporte de conidios por el viento (Agrios, 1997).

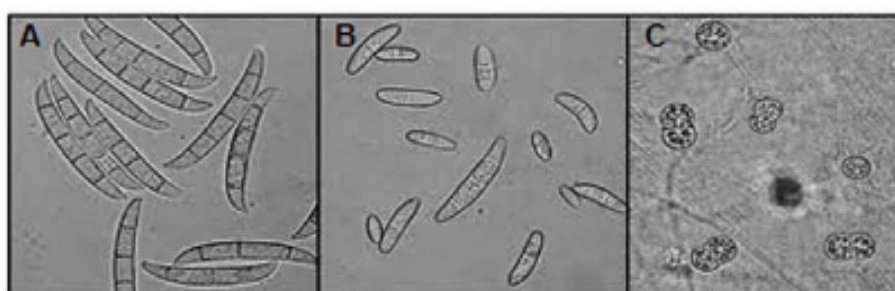


Figura 1. Tipos de esporas en *Fusarium*: **A** Macroconidios. **B** Microconidios. **C** Clamidoporas. Modificada de Miguel-Rojas, 2014.

F. oxysporum puede permanecer largos períodos de tiempo en el suelo, principalmente como clamidospora o creciendo en restos de materia orgánica o exudados de raíces (estado saprofítico) (Beckman, 1987). Las clamidosporas pueden

permanecer en estado latente hasta que se estimula la germinación por los nutrientes liberados de las raíces. La invasión de las raíces es seguida por la penetración del tallo (estado parasítico), la colonización de los tejidos vasculares y el desarrollo de la enfermedad (estado patogénico), produciendo la marchitez vascular sistémica (Agrios, 2005). Mientras la planta está viva, el crecimiento del hongo se limita a los tejidos del xilema y a algunas células adyacentes. Solo cuando la planta muere, el hongo se desarrolla fuera del sistema vascular, en las células adyacentes del parénquima, produciendo grandes cantidades de conidios y clamidosporas (Agrios, 2005).

Carotenoides

Naturaleza química de los carotenoides

Los carotenoides son pigmentos tetraterpenoides procedentes de la fusión de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato (GGPP), presentes en todos los organismos fotosintéticos, pero producidos también por muchas bacterias y hongos (Britton *et al.*, 1998). Son moléculas lineales hidrocarbonadas de longitud variable, con dobles enlaces conjugados, que pueden presentar anillos cerrados en los extremos de la cadena. Según las sustituciones que presente, se clasifican en (I) carotenos, los formados sólo por carbono e hidrógeno, o (II) xantofilas, que contienen además oxígeno. Los dobles enlaces conjugados les confieren la capacidad de absorber radiación del espectro visible y son responsables del color característico de cada uno de ellos, habitualmente en el rango del rojo al amarillo. El color de cada carotenoide depende tanto del número de dobles enlaces conjugados, como de la presencia de anillos en la molécula.

Funciones de los carotenoides

Funciones de los carotenoides en los animales y las plantas

Como se ha mencionado anteriormente, los carotenoides están presentes en la mayoría de los seres vivos. Sin embargo, salvo muy raras excepciones en insectos, los animales no son capaces de sintetizarlos.

Los carotenoides son esenciales en las plantas, ya que están involucrados en diversos procesos biológicos, como el ensamblaje del fotosistema, la recepción de la luz, la fotoprotección, el “quenching” (extinción de singletes de oxígeno molecular) y la fotomorfogénesis (Cuttriss y Pogson, 2006). Su presencia es abundante, aunque normalmente se ven enmascarados por la clorofila. Su función en organismos fotosintéticos es actuar como pigmentos fotorreceptores, absorbiendo la luz y transfiriéndola en forma de energía a los centros de reacción de la fotosíntesis (Edge *et al.*, 1997). En las plantas, los carotenoides proporcionan también colores llamativos a

las flores y los frutos, facilitando la atracción de los animales y, en consecuencia, la polinización o la dispersión de semillas. Sin embargo, las rutas de biosíntesis de carotenoides están presentes en muchos organismos no fotosintéticos, como los hongos (Sandmann y Misawa, 2002). Los carotenoides tienen importantes aplicaciones biotecnológicas, son ampliamente usados en cosmética y en alimentación, figurando los hongos entre los organismos usados para su producción industrial (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 2004).

Los carotenoides también poseen funciones relevantes en los animales, principalmente como precursor de retinal y de ácido retinoico, los cuales están involucrados en la visión y en la morfogénesis, respectivamente (von Lintig, 2010). Generalmente los animales son incapaces de producir estos pigmentos *de novo*, por lo que se obtienen a través de la dieta. Sin embargo, recientemente se descubrió que el insecto *Acyrtosiphon pisum* sintetiza toruleno, que le proporciona su color rojo, y que en su genoma posee los genes necesarios para su biosíntesis (Moran y Jarvik, 2010). En algunos animales, como los crustáceos, los peces y las aves, la ingesta de carotenoides es necesaria para adquirir su pigmentación, la cual afecta a su etología, por ejemplo, a la atracción sexual (Faivre et al., 2003; Blount et al., 2003). Todo ello refleja el papel secundario que pueden jugar los carotenoides como pigmentos. Además, los carotenoides tienen otras funciones derivadas de sus especiales características químicas. Al ser pigmentos hidrofóbicos, se localizan en las membranas celulares, afectando su fluidez. Poseen propiedades antioxidantes que les permiten neutralizar las moléculas de oxígeno singlete (Conn et al., 1991) y los radicales generados en la peroxidación lipídica (Sies y Stahl, 1995). Pueden actuar sinérgicamente con otras vitaminas como protectores ante la fotooxidación (Edge et al., 1997; Stahl y Sies, 2002), por lo que al consumo de carotenoides se le atribuye un papel beneficioso en la protección frente al envejecimiento, el cáncer o la mejora en la respuesta inmunológica (Eggersdorfer y Wyss, 2018).

Los carotenoides, muy especialmente el β -caroteno (provitamina A), son importantes para la salud en la especie humana. El retinal es necesario en la visión, como cromóforo de las opsinas visuales, y es la fuente de ácido retinoico, una señal reguladora de gran importancia en cordados. En el caso del β -caroteno, existen sistemas específicos de asimilación y enzimas encargadas de su metabolismo (von Lintig et al., 2005). Los tejidos animales retienen cantidades considerables de diferentes carotenoides, como el licopeno, la zeaxantina y la luteína, que unen su efecto antioxidante al del β -caroteno. Además, la zeaxantina y la luteína, presentes en la mácula lútea, se comportan como un filtro de protección de las células de la retina, que disminuye la aberración cromática (Snodderly et al., 1995; Landrum y Bone, 2001). La deficiencia en el consumo de luteína está asociado con diferentes anomalías de la

visión que pueden derivar en ceguera, como las cataratas o la degeneración macular (Moeller et al., 2000).

Función de los carotenoides en los hongos

Hasta la fecha, no se conoce con claridad la función de los carotenoides en los hongos. Numerosas observaciones experimentales sugieren que su papel principal es la protección frente a la oxidación (Gessler et al., 2002). La luz aumenta el estrés oxidativo de la célula, lo que explicaría la frecuente regulación por luz de la carotenogénesis en estos organismos (Avalos et al., 1993). En *F. fujikuroi*, los carotenoides no parecen ser el cromóforo responsable de las fotorrespuestas, tales como la inducción de la conidiación o de la propia síntesis de carotenoides. El descubrimiento de proteínas de la familia de las opsinas en hongos (Thewes et al., 2005) ha abierto nuevas perspectivas sobre las funciones de los carotenoides en este grupo taxonómico, ya que, como se ha indicado anteriormente, muchas de estas proteínas requieren retinal para ser funcionalmente activas.

En otros hongos se ha observado cierta relación entre la carotenogénesis y el estrés oxidativo. El oxígeno en estado singlete estimula la carotenogénesis en la oscuridad en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Schroeder y Johnson, 1995). Los mutantes en los genes *sod-1* (Yoshida y Hasunuma, 2004) o *cat-3* (Michán et al., 2003) de *Neurospora crassa* muestran una mayor acumulación de carotenoides que la estirpe silvestre en la luz. Los genes *sod-1* y *cat-3* están involucrados en la defensa frente al estrés oxidativo. En *Fusarium aquaeductuum*, una especie próxima a *F. fujikuroi*, la carotenogénesis se estimula por p-hidroximercuribenzoato en la oscuridad (Rau et al., 1967) y por azul de metileno o azul de toluidina en presencia de luz roja (Lang-Feulner y Rau, 1975). Todas estas observaciones sugieren un papel protector de los carotenoides frente al estrés oxidativo, aunque no se descartan que tengan una función secundaria.

Ciertos zigomicetos, como *Blakeslea trispora* o *Phycomyces blakesleeanus*, emplean moléculas derivadas de los apocarotenoides como hormonas sexuales. Estas hormonas, llamadas ácidos trispóricos, se sintetizan a partir del β -caroteno (Austin et al., 1970; Polaino et al., 2010). Por ese motivo, los mutantes de *P. blakesleeanus* bloqueados en la ruta biosintética de los carotenoides son sexualmente incompetentes (Sutter, 1975). No está claro si ésta es la única función del β -caroteno en estos organismos.

Síntesis de los carotenoides en los hongos

La capacidad de sintetizar carotenoides es un carácter frecuente en los hongos. Tanto la enzimología de las rutas como su regulación han sido objeto de estudio muy detallado, especialmente en *N. crassa*, *P. blakesleeanus*, *Mucor circinelloides* y *F.*

fujikuroi (Sandmann y Misawa, 2002; Avalos et al., 2014). La comparación de sus rutas biosintéticas muestra que son similares en los primeros pasos y que se diversifican en los pasos posteriores para dar en algunos casos carotenos y en otros xantofilas. Entre los principales carotenoides producidos por los hongos destacan el β -caroteno, con dos anillos β en los extremos, la astaxantina, que lleva un radical hidroxilo y un grupo cetónico en sus anillos β , y la neurosporaxantina (NX), apocarotenoide de C_{35} químicamente definido como ácido β -apo-4'-carotenoico (Aasen y Jensen, 1965). La NX no es un carotenoide frecuente en hongos; hasta la fecha, además de producirlo los géneros *Neurospora* y *Fusarium* se ha encontrado en *Verticillium* (Valadon et al., 1969; 1982) y *Podospora* (Strobel et al., 2009).

La ruta biosintética empieza con el isopentil pirofosfato (IPP), primer compuesto en la síntesis de terpenoides (Figura 2). El IPP se puede sintetizar por dos vías, por una parte a partir de hidroximetil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) (vía del mevalonato) y por otra parte, a partir de la D-1-deoxixilulosa 1-fosfato, generada por la condensación del piruvato y del gliceraldehído 3-fosfato (vía del no-mevalonato). El IPP se condensa con un isómero de sí mismo, el dimetilalil pirofosfato (DMAPP), para dar lugar al geranil pirofosfato (GPP, C_{10}). Dos nuevas reacciones de condensación dan lugar al farnesil pirofosfato (FPP, C_{15}) y al geranilgeranil pirofosfato (GGPP, C_{20}). Seguidamente dos moléculas de GGPP se condensan para dar fitoeno (C_{40}). El fitoeno es la primera molécula incolora con características alifáticas estructurales de carotenoides. Los siguientes pasos de la ruta consisten en la introducción de dobles enlaces conjugados que le confieren la capacidad de absorber luz, proporcionando colores característicos que van desde el amarillo hasta el rojo. Esta reacción la lleva a cabo una desaturasa, que introduce al menos 4 dobles enlaces conjugados. La molécula de fitoeno tiene un eje central de simetría, y las desaturaciones se realizan por pares a cada lado del eje central. Los extremos parcialmente desaturados pueden ser objeto de ciclación. Existen varias ciclasas dependiendo del tipo de anillo introducido: α , β o γ . En los hongos estudiados, los anillos son de tipo β .

En hongos, las actividades sintasa y ciclasa de fitoeno residen en una única enzima bifuncional, inicialmente descubierta en *P. blakesleeanus* mediante métodos genéticos (Ootaki et al., 1973; Torres-Martínez et al., 1980; Roncero y Cerdá-Olmedo E. 1982), y confirmada posteriormente a nivel molecular en éste y otros hongos (Verdoes et al., 1999a; Arrach et al., 2001). La ciclación de un extremo del licopeno produce γ -caroteno y la ciclación del otro extremo produce β -caroteno. En total, ocurren cuatro desaturaciones y dos ciclaciones β , lo que se conoce como ruta de Porter y Lincoln (Porter y Lincoln, 1950). Dicha ruta está presente en diversos hongos mucorales, el orden más estudiado dentro de los zigomicetos, como *P. blakesleeanus* (Cerdá-Olmedo, 1987), *Mucor circinelloides* (Fraser et al., 1996) o *B. trispora* (Metha et al., 2003), éste último empleado en la producción de β -caroteno a escala industrial

(Avalos y Cerdá-Olmedo, 2004). En los mucorales investigados, los pasos enzimáticos desde GGPP hasta β -caroteno dependen de dos únicos genes estrechamente ligados y orientados en dirección opuesta (Ruiz-Hidalgo et al., 1997; Velayos et al., 2000; Arrach et al., 2001; Rodríguez-Sáiz et al., 2004).

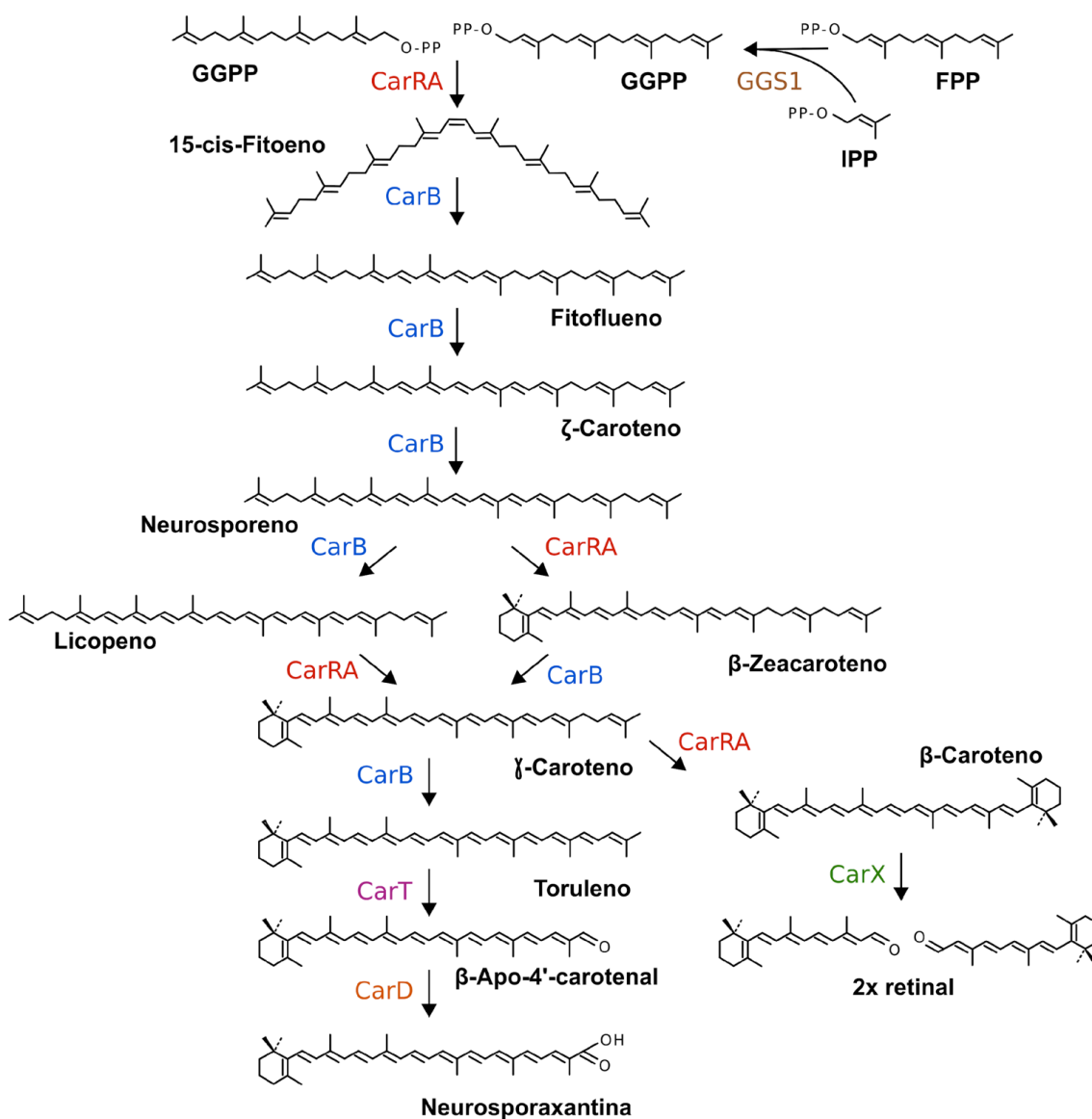


Figura 2. Ruta de síntesis de carotenoides en *Fusarium*. En cada paso se indica el producto de cada reacción y la enzima que la cataliza. Modificado de Avalos et al., 2017

Los ejemplos de carotenogénesis estudiados en muchos hongos no zigomicetos no siguen el modelo de la ruta de Porter y Lincoln, produciendo en muchos casos xantofilas. Entre ellos destacan el basidiomiceto *Xanthophyllomyces dendrorhous*, que acumula astaxantina, y el ascomiceto *N. crassa*, que produce neurosporaxantina (NX). La astaxantina procede de la introducción de grupos ceto y carboxilo en los anillos terminales β . Todos los genes responsables de la producción de astaxantina en *X.*

dendrourous, *crtl*, *crtyB* (ortólogos de *carRA* y *carB* en *F. oxysporum*, respectivamente, ver página siguiente) y *ast* (necesario para la conversión de β -caroteno en astaxantina) han sido clonados y caracterizados (Verdoes et al., 1999a; 1999b; Ojima et al., 2006). El interés de *X. dendrourous*, anteriormente conocido como *Phaffia rhodozyma* (Miller et al., 1976), reside en su uso para la producción industrial de astaxantina (Johnson y Schroeder, 1996).

N. crassa es un modelo genético extensamente estudiado (Davis, 2000). Gracias a la facilidad del análisis genético de este organismo, en él se identificaron los primeros genes de carotenogénesis de hongos. Dichos genes, localizados en diferentes posiciones del genoma, son: *al-1*, que codifica la desaturasa (Schmidhauser et al., 1990), *al-2*, que codifica la sintasa de fitoeno/ciclase (Schmidhauser et al., 1994; Arrach et al., 2002) y *al-3*, que codifica la sintasa de GGPP (Sandmann et al., 1993). Posteriormente se identificaron los genes *cao-2* (Saelices et al., 2007) e *ylo-1* (Estrada et al., 2008), que codifican las enzimas de los pasos finales de la síntesis de NX, y cuyas reacciones son coincidentes con las de la ruta de *Fusarium*.

Síntesis de los carotenoides en *Fusarium*

El carotenoide principal en *Fusarium*, responsable de su típica pigmentación anaranjada, es la NX. La presencia de la NX se detectó inicialmente en *F. aquaeductuum* junto con otros precursores de carotenoides neutros, como ζ -caroteno, neurosporeno, licopeno, γ -caroteno y toruleno (Bindl et al., 1970). Estudios posteriores en *F. fujikuroi* corroboraron la misma composición de carotenoides de *F. aquaeductuum*, excepto que se detectó β -zeacaroteno en lugar de licopeno. Esto indica que la ciclación se puede conseguir a través de neurosporeno o licopeno dependiendo de la especie.

Desde el fitoeno, con 5 desaturaciones y una ciclación en el extremo no saturado, se obtiene el toruleno, de color rojo (Figura 2). Los pasos desde toruleno a NX se dedujeron a partir de la actividad enzimática de las enzimas responsables. En *F. fujikuroi* se detecta también β -caroteno, mostrando que la ciclase CarRA es capaz de reconocer γ -caroteno como sustrato (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). A causa de su grupo carboxílico, la NX puede encontrarse esterificada, como ocurre en una especie marina de *Fusarium*, donde una parte de la misma se acumula como glicosil-éster (Sakaki et al., 2002).

Genes de la ruta de carotenogénesis en *Fusarium*

La identificación de los genes responsables de esta ruta en *Fusarium* comenzó con la identificación del gen *carB* de *F. fujikuroi* (Fernández-Martín et al., 2000), basada en el parecido con la secuencia del gen *al-1* de *N. crassa* (Schmidhauser et al., 1990). La función de este gen fue confirmada por complementación de un mutante albino

que acumula fitoeno y por la generación del mismo fenotipo en la mutación dirigida del gen *carB*. La enzima CarB es responsable de los 5 pasos de desaturación en la ruta de biosíntesis de NX, como indica la identificación de un alelo mutante específicamente afectado en la quinta desaturación (Prado-Cabrero et al., 2009).

Por su cercanía al gen *carB*, el siguiente gen que se descubrió fue el gen *carRA*, ortólogo del gen *al-2* y que codifica la fitoeno sintasa de *N. crassa* (Schmidhauser et al., 1994). De esto se concluyó que *carRA* codifica la fitoeno sintasa de *Fusarium* lo cual es consistente con el fenotipo albino de sus mutantes (Linnemannstöns et al., 2002). En ambas especies, un dominio carboxílico con similitud a las ciclasa de carotenos precede al dominio fitoeno sintasa. El dominio ciclasa tiene una alta conservación con el mismo dominio del gen *crtYB*, ortólogo de *carRA* en la levadura *X. dendrorhous*, donde la actividad ciclasa se demostró bioquímicamente (Verdoes et al., 1999b). No se han descrito mutantes específicos de la actividad ciclasa en *Fusarium* pero los mutantes del dominio ciclasa del gen *al-2* de *N. crassa* son defectuosos en los pasos de ciclación (Arrach et al., 2002; Díaz-Sánchez et al., 2011b). Todo ello sugiere que el dominio amino de la proteína CarRA de *F. fujikuroi* tiene la misma función.

Las reacciones desde toruleno a NX incluyen un paso de escisión, típicamente llevado a cabo por enzimas conocidas como oxigenasas de carotenoides (Sui et al., 2013). Un gen de esta familia, *carX*, colinda con *carRA* y se transcribe de manera divergente a él. Sin embargo, su mutación dirigida no impide la síntesis de NX (Thewes et al., 2005) y el estudio de su actividad enzimática reveló que corta simétricamente al β -caroteno para producir retinal (Prado-Cabrero et al., 2007b). Es interesante que junto al *cluster carX/carRA/carB* se encuentra un gen que codifica una rodopsina, *carO*, y su regulación es similar al resto de los genes del *cluster* (revisado por Avalos et al., 2017). Usualmente, el retinal se une a las rodopsinas como un grupo prostético que absorbe luz, aportando coherencia a la organización génica del *cluster*: los genes *carRA*, *carB* y *carX* son necesarios para producir retinal, el cual presuntamente lo usa la rodopsina codificada por el gen *carO*.

El retinal puede ser usado también por una segunda rodopsina codificada por el gen *opsA* (Estrada y Avalos, 2009). Además, el genoma de *Fusarium* contiene un gen para una aldehído deshidrogenasa muy similar a la enzima retinaldeído deshidrogenasa (RALDH) que convierte el retinal en ácido retinoico en mamíferos. Esta enzima, llamada CarY, se investigó en *F. verticilloides* y se demostró su actividad enzimática *in vitro* (Díaz-Sánchez et al., 2016). La mutación dirigida del gen *carY* en *F. verticilloides* no tiene efectos en la carotenogénesis pero provoca diversas alteraciones en el desarrollo. Sin embargo, el ácido retinoico no se pudo detectar en el micelio de *Fusarium* y la función biológica de CarY no se ha establecido por tanto de forma concluyente (revisado Avalos, et al. 2017).

Los genes de *Fusarium* responsables de los pasos desde toruleno a NX han sido recientemente descritos. La búsqueda de genes para otras supuestas oxigenasas de carotenoides en la base de datos del genoma de *Fusarium* permitió identificar el gen *carT*, cuya función fue revelada por la presencia de una mutación en dicho gen en un mutante que acumula toruleno y por su complementación genética con el alelo silvestre de *carT* (Prado-Cabrero et al., 2007a). Como confirmación bioquímica, la enzima CarT purificada se comprobó que realiza *in vitro* el corte del toruleno para producir β -apo-4'carotenal. Otras investigaciones mostraron que la mutación dirigida de su ortólogo en *N. crassa*, *cao-2*, provoca el bloqueo en la producción de NX y la acumulación de toruleno (Saelices et al., 2007). Estos datos establecen una nueva clase de enzima en la familia de las oxigenasas de carotenoides. La función del gen *carT* en la carotenogénesis de *Fusarium*, junto con *carRA* y *carB*, fue confirmada por la mutación dirigida de los genes en *Gibberella zeae*, teleomorfo de *Fusarium graminearum* (Jin et al., 2010).

El producto del gen *carT*, el β -apo-4'carotenal, requiere de una oxidación para producir NX. El gen responsable de este paso se descubrió por primera vez en *N. crassa* gracias al estudio del mutante *ylo*, llamado así por su color amarillo. Este mutante exhibe un desconcertante fenotipo, con un contenido complejo contenido en carotenoides que varía con las condiciones de cultivo y que no incluye NX (Goldie y Subden, 1973; Sandmann, 1993). El gen responsable de esta mutación, *ylo-1*, codifica una aldehído deshidrogenasa y media el último paso de la biosíntesis de NX, como se demostró con la complementación de la mutación de *ylo-1* y con la capacidad de purificar la proteína YLO-1 para convertir β -apo-4'carotenal en NX *in vitro* (Estrada et al., 2008). Este descubrimiento permitió la identificación de su gen ortólogo en *F. fujikuroi*, llamado *carD* (Díaz-Sánchez et al., 2011a). La función de *carD* se confirmó mediante su mutación dirigida, que daba lugar a una pérdida de NX y una acumulación inusual de carotenoides, interpretados como derivados del β -apo-4'carotenal.

El gen necesario para la ruptura del toruleno, *carT* y el gen necesario para la oxidación final a NX, *carD*, se ubican en otras regiones del genoma distintas del *cluster carX/carRA/carB/carO* (Figura 3). Esta organización genómica se conserva en los genomas de otras especies de *Fusarium* disponibles en la base de datos (revisado por Avalos et al., 2017).

De lo expuesto anteriormente cabe destacar la sinergia que ha existido entre las investigaciones sobre los genes de la ruta de carotenogénesis en *N. crassa* y *F. fujikuroi*. Sin embargo, a pesar de las similitudes aparentes, existen diferencias llamativas entre ambos hongos en cuanto a la bioquímica y la regulación de la ruta. Un ejemplo es la combinación de análisis de mutantes y estudios enzimáticos que indican que en *N. crassa* el orden en el que se producen las reacciones puede diferir aunque el

producto final de la ruta sea el mismo. En ciertas condiciones de cultivo se ha encontrado en *N. crassa* apo-4'-licopenal y ácido apo-4'-licopenoico como intermediarios, lo que indica que la reacción de ciclación llevada a cabo por AL-2 actúa en el último paso de la ruta (Estrada et al., 2008).

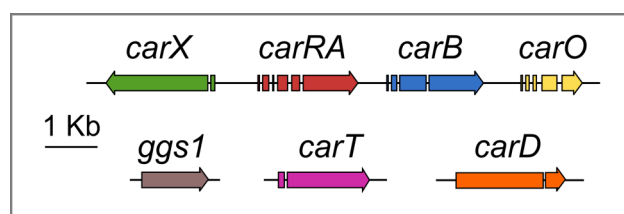


Figura 3. Organización genómica de los genes responsables de la carotenogénesis en *Fusarium*. Los genes *ggs1*, *carT* y *carD* no se encuentran agrupados con el resto de los genes estructurales. Los huecos en los genes representan los intrones. Modificado de Avalos et al., 2017.

Regulación de la carotenogénesis

Regulación por luz

Las primeras observaciones en *F. oxysporum* revelaron que la iluminación promueve la acumulación de carotenoides en el micelio (Carlile, 1956). Los primeros estudios del efecto de la luz sobre la carotenogénesis se llevaron a cabo en *F. aquaeductuum*. En una investigación inicial, se centraron en el efecto de la temperatura en la fotoinducción. La cinética de respuesta a la exposición a luz muestra una acumulación gradual de carotenoides que alcanzaba un máximo aproximadamente a las 12 horas después del inicio de la iluminación. Sin embargo, el contenido en carotenoides aumentaba lentamente durante al menos tres días de cultivo bajo luz continua (Rau, 1967). Respecto al efecto de la temperatura, la síntesis de carotenoides coloreados disminuye a bajas temperaturas, mientras que la reacción primaria a la luz, presuntamente un proceso fotoquímico, es independiente de la temperatura en el rango de 5-25 °C.

La fotoinducción no es efectiva en condiciones anaerobias, como indica la pérdida de acumulación de carotenoides si el micelio iluminado se transfiere a una atmósfera carente de oxígeno (Rau, 1971). Sin embargo, el estado de fotoinducción se mantiene, como indica el inicio de la biosíntesis de carotenoides si las condiciones aeróbicas se restauran, incluso en la oscuridad. Con aireación, la fotoinducción requiere la síntesis de proteínas, como lo muestra la pérdida de respuesta si se añade cicloheximida al cultivo antes o inmediatamente después de la exposición a la luz (Rau, 1967). Como ocurre con la anaerobiosis, la retirada de la cicloheximida permite que arranque la acumulación de carotenoides en cualquier momento en la oscuridad, al

menos dentro de las primeras 30 horas, indicando de nuevo una alta estabilidad del estado de inducción del sistema de fotorrecepción.

En *F. aqueductum*, el efecto de la luz puede ser reemplazado parcialmente por la adición de reactivos sulfidrilos oxidantes, como el p-cloro y p-hidroximercuribenzoato (Rau, 1967; Rau et al., 1967), o el peróxido de hidrógeno, reactivo oxidativo, sugiriendo que la oxidación de los grupos –SH juegan un papel en el sistema de detección de la luz. En consecuencia, la fotoinducción desaparece si se añaden agentes reductores, como el ditionito y la hidroxilamina, pero la respuesta se recupera si se retira el agente reductor, indicando la recuperación del sistema fotorreceptor (Theimer y Rau, 1970). Sin embargo, mientras que una corta exposición de luz es suficiente para sostener la fotoinducción, el p-hidroximercuribenzoato debe estar todo el tiempo presente para mantener su efecto estimulante, y tal estimulación es aditiva con la de la luz (Theimer y Rau, 1972) lo que indica diferentes mecanismos de acción. Además, el p-hidroximercuribenzoato añadido en la oscuridad no tiene efecto en *F. fujikuroi*, y en su presencia muestra una fotoinducción similar (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1986).

En *N. crassa*, un hongo con espectro de acción similar para la biosíntesis de carotenoides inducida por luz (De Fabo et al., 1976), la fotoinducción es totalmente dependiente del complejo White Collar, que consiste en dos fotorreceptores WC-1 y WC-2 (revisado por Fischer et al., 2016). Sin embargo, los mutantes de los genes ortólogos *wc-1*, llamados *wcoA* en *F. fujikuroi* (Estrada y Avalos, 2008) y *wc1* en *F. oxysporum* (Ruiz-Roldán et al., 2008) conservan, con diferentes grados de eficiencia, la producción de carotenoides en luz continua. La mutación dirigida de los genes ortólogos *wc-1* y *wc-2* en *F. graminearum*, *fgwc-1* y *fgwc-2*, provocó una pigmentación pálida en la superficie de las colonias bajo la luz, pero los niveles de carotenoides no se determinaron químicamente ni en la estirpe silvestre ni en los mutantes (Kim et al., 2014).

El análisis de la acumulación de carotenoides en cultivos en cajas reveló dos respuestas en *F. fujikuroi*, primero, una respuesta rápida dependiente del fotorreceptor WcoA y una segunda fase de acumulación de carotenoides más lenta que depende de una flavoproteína, el criptocromo DASH CryD (Castrillo y Avalos, 2015). La fotoactividad de este criptocromo se demostró experimentalmente (Castrillo et al., 2015) y su participación como segundo fotorreceptor explica el mantenimiento de la acumulación de carotenoides en los mutantes *wcoA* en iluminación continua. Los fotorreceptores WcoA y CryD no sólo están involucrados en la regulación de la carotenogénesis, como indica la alteración en la producción de otros pigmentos y metabolitos secundarios en sus correspondientes mutantes. En el caso del mutante $\Delta wcoA$ las alteraciones se observan incluso en la oscuridad.

La fotoinducción de la carotenogénesis en *Fusarium* (Figura 4) se manifiesta externamente por la adquisición de pigmentación anaranjada del micelio crecido en la oscuridad en un margen de horas, y conlleva un rápido incremento de los niveles de transcritos de la mayoría de los genes estructurales. Los experimentos de *northern blot* en *F. fujikuroi* mostraron una cinética de inducción similar en los cuatro genes del cluster *car*, *carRA*, *carB*, *carO* (Prado et al., 2004) y *carX* (Thewes et al., 2005), al igual que *carT* (Prado-Cabrero et al., 2007a).

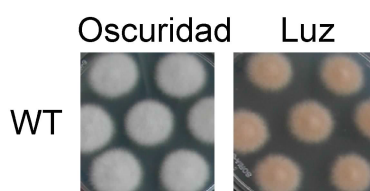


Figura 4. Fotoinducción de la carotenogénesis en el silvestre de *F. oxysporum* cultivada durante 7 días en condiciones de oscuridad y bajo iluminación continua. Modificado de Rodríguez-Ortiz, 2012.

Los transcritos de estos genes alcanzan su máximo nivel tras una hora de exposición a la luz y después caen lentamente, un fenómeno que se conoce como fotoadaptación. Este patrón de fotoinducción se ha confirmado por RT-qPCR y se ha observado también en *F. oxysporum* (Rodríguez-Ortiz et al., 2012) (Figura 5), y en *F. verticilloides* (Adám et al., 2011). La fotorrespuesta transcripcional es similar a la mostrada por los genes ortólogos en *N. crassa* (revisado por Avalos y Corrochano, 2013), con excepción del gen *al-3* (GGPP sintasa), que muestra en este hongo una fuerte fotoinducción mientras que su ortólogo en *F. fujikuroi* *ggs1*, se ve menos afectado por la luz (Mende, et al., 1997).

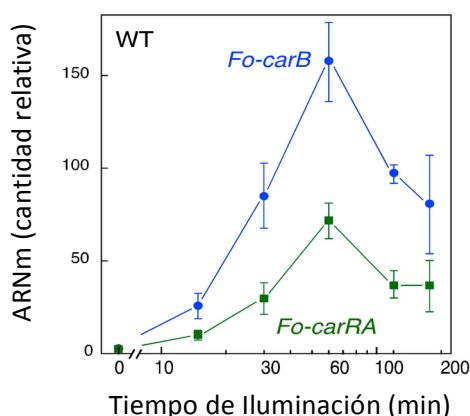


Figura 5. Cinética de expresión de los genes estructurales, *carRA* y *carB* en la estirpe silvestre 4287 de *F. oxysporum*. Los niveles de los transcritos se determinaron por PCR cuantitativa a tiempo real y se refirieron al gen de la β -tubulina. A los niveles de cada gen en oscuridad se les dió el valor 1. Modificado de Rodríguez-Ortiz, 2012.

Datos recientes de secuenciación masiva de ARN han revelado, sin embargo, una fotoinducción significativa en los niveles de ARNm de este gen en *F. fujikuroi* (Avalos et al., 2017). El gen *carD* de *F. fujikuroi* muestra una fotorrespuesta menor (Estrada et al., 2008), lo cual se confirmó con los datos de ARN-Seq (Avalos et al.,

2017). Sin embargo, no se detectó fotoinducción en el caso de su ortólogo de *N. crassa*, *ylo-1* (Díaz-Sánchez et al., 2011a).

El estudio de la fotoinducción transcripcional de los genes estructurales de la carotenogénesis en los mutantes de los genes *wcoA* y *cryD* refleja los diferentes mecanismos de acción de los fotorreceptores que codifican (Castrillo y Avalos, 2015). Tras la iluminación, los mutantes *wcoA* muestran fotoinducción de la carotenogénesis, pero acumulan carotenoides más lentamente y su concentración no alcanza los valores de la estirpe silvestre. Sin embargo, el contenido de carotenoides y los niveles de ARN mensajeros de los genes estructurales son mucho más bajos en la oscuridad en los mutantes *wcoA* que en la estirpe silvestre. Es más, la fotoinducción transcripcional de los genes *car* está básicamente ausente en los mutantes *wcoA*, con niveles de ARN mensajeros después de la iluminación más bajos que en la estirpe silvestre en oscuridad. Por lo tanto, la inducción de la carotenogénesis por fotorreceptores alternativos, presuntamente CryD, debe darse a través de un mecanismo independiente de la transcripción. La base molecular de tal mecanismo aún no se ha esclarecido (revisado por Avalos et al., 2017).

La caída de los niveles de ARN mensajero después de la fotoinducción se ha investigado en detalle en *N. crassa*. En este hongo, el pequeño fotorreceptor de flavina VIVID (VVD), juega un papel en la desactivación del sistema fotorreceptor WC después de la iluminación (revisado por Avalos y Corrochano, 2013). Por el contrario, la mutación del ortólogo de VVD en *F. fujikuroi*, llamado *vvdA*, provoca una disminución en la acumulación de carotenoides en este hongo (Castrillo y Avalos, 2014). La cinética de carotenogénesis en los mutantes *vvdA* muestra una rápida acumulación de carotenoides inmediatamente después de la exposición de la luz, consistente con una atenuación por VvdA de la fotoinducción mediada por WcoA, pero la acumulación es más lenta después de estar creciendo un tiempo prolongado bajo la luz, sugiriendo una función de regulación positiva durante el segundo estadio de fotoinducción.

Regulación mediada por el gen *carS*

El desarrollo de protocolos de mutagénesis permitió la identificación de mutantes de *Fusarium* afectados en la síntesis de carotenoides, fácilmente distinguibles por sus cambios de pigmentación (Figura 6). Los mutantes pueden ser albinos en la luz, en cuyo caso pueden tener afectadas las enzimas de los primeros pasos de la ruta o tener una mutación regulatoria, o pueden tener pigmentación anaranjada en la oscuridad, en cuyo caso son mutantes necesariamente de la regulación. Los mutantes fuertemente pigmentados en oscuridad se han descrito en *F. fujikuroi* (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987) y *F. oxysporum* (Rodríguez-Ortiz et al., 2012) y se les denomina genéricamente mutantes *carS*. Estos mutantes, que han recibido especial atención en *F. fujikuroi*, acumulan una cantidad creciente de carotenoides a

medida que el cultivo envejece (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1986) y tienen cantidades elevadas de ARNm de los genes estructurales, desde *carRA* hasta *carD* (Thewes et al., 2005; Prado-Cabrero et al. 2007b; Díaz-Sánchez et al., 2011a; Prado et al., 2004). A causa de su alto contenido en carotenoides, el efecto de la luz es menos aparente en los mutantes *carS*, pero estudios de expresión han encontrado una fotoinducción de los niveles de los transcritos de los genes estructurales tanto en mutantes *carS* de *F. fujikuroi* (Prado-Cabrero et al., 2007b) como de *F. oxysporum* (Rodríguez-Ortiz et al., 2012), la cual ha sido corroborado en análisis de ARN-Seq en ambas especies (Figura 7 y resultados del Capítulo 2).

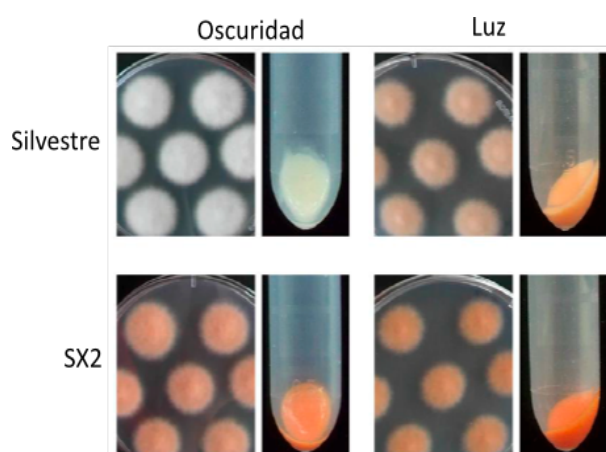


Figura 6. Fenotipo del micelio y las esporas de la estirpe silvestre 4287 de *F. oxysporum* y su mutante *carS*, SX2 en oscuridad y en luz. Los micelios se cultivaron durante 7 días tanto en condiciones de oscuridad como de luz. Modificado de Avalos et al., 2017.

La composición cualitativa de los carotenoides acumulados por mutantes *carS* de dos fondos genéticos diferentes de *F. fujikuroi*, obtenidos a partir de las estirpes silvestres IMI 58289 y FKMC 1995, respectivamente, es similar (Avalos et al. 2017). Ambos mutantes contienen una mezcla de carotenoides con los mismos intermediarios que la de ambas estirpes silvestres en condiciones de iluminación.

Debido a su intensa pigmentación, los mutantes *carS* se han usado como herramientas para detectar mutantes con alteraciones en la mezcla de intermediarios de carotenoides. Por ejemplo, sirvieron para la identificación de mutantes que acumulan toruleno (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987) o mutantes con alteraciones en el reconocimiento del sustrato de la desaturasa CarB (Prado-Cabrero et al., 2009). Los mutantes *carS* han sido un fondo genético óptimo para comprobar el efecto de posibles inhibidores de la carotenogénesis de *Fusarium*, demostrando la eficiencia diferencial de algunos inhibidores de ciclasas, que sin embargo eran muy activos en otras especies (Avalos y Cerdá-Olmedo 1986).

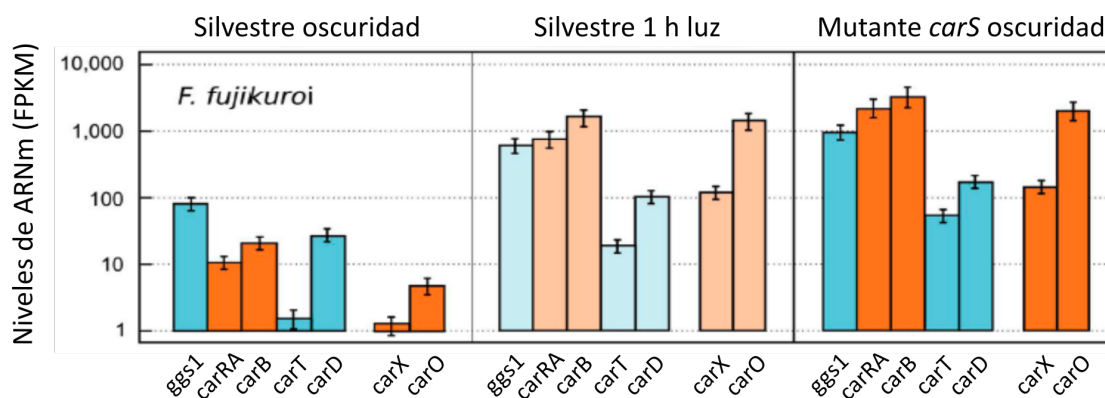


Figura 7. Efecto de la luz y la mutación *carS* en los niveles relativos de ARNm de los genes implicados en el metabolismo de carotenoides en *F. fujikuroi*. Los genes se han agrupado de acuerdo a sus funciones, *ggs1*, *carRA*, *carB*, *carT* y *carD* para la biosíntesis de NX, y *carX* y *carO* para la biosíntesis de retinal. Modificado de Avalos et al., 2017.

El gen responsable del fenotipo *carS* se identificó a partir de mutantes anaranjados de *F. oxysporum* obtenidos por inserción del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*. El proceso que llevó a conocer la secuencia del gen *carS* se describe en la introducción del Capítulo 1. Una vez conocida la secuencia, se comprobó que todos los mutantes *carS* conocidos hasta ese momento tienen mutaciones en dicho gen. Además se demostró que la mutación dirigida del mismo provoca un incremento de la concentración de carotenoides (Rodríguez-Ortiz et al., 2012) así como que la complementación de la mutación *carS* en *F. fujikuroi* restablecía el fenotipo silvestre (Rodríguez-Ortiz et al., 2013).

El gen *carS* codifica una proteína de la familia “RING finger” (RF) con una secuencia similar a la de la proteína CrgA de *M. circinelloides*, cuya mutación provoca también superproducción de carotenoides (Navarro et al., 2001; Lorca-Pascual et al., 2004). El grado de similitud entre las proteínas CarS y CrgA no es muy alto, lo cual no es sorprendente al proceder de dos hongos muy distantes taxonómicamente, pero ambas proteínas comparten los dominios más relevantes. Estos incluyen 2 dominios RF en la región del extremo amino, uno de ellos inicialmente ignorado en CarS por un error de asignación de un intrón en la anotación del genoma de *F. fujikuroi* (Ruger-Herreros, 2016), y un dominio de proteasa LON (Navarro et al., 2000). Por el contrario, estos dominios sí estaban presentes en la anotación del genoma *F. oxysporum*.

CrgA tiene además dos regiones ricas en glutaminas y un sitio de isoprenilación próximo al extremo carboxilo terminal. En cambio, CarS no parece tener zonas ricas en glutaminas o están poco representadas y carece de sitio de isoprenilación. En otras proteínas, los dominios RF interactúan con una enzima ligasa de ubiquitina tipo 3 (E3), que media la ubiquitinación de proteínas dianas, frecuentemente como una marca

para su degradación. La función de CrgA de *M. circinelloides* ha recibido considerable atención y la información disponible puede proporcionar pistas del posible mecanismo de acción de CarS en *Fusarium*. Al menos uno de los dominios RF de CrgA es esencial para su función reguladora en la carotenogénesis, sugiriendo que éste podría funcionar como una ligasa de ubiquitina tipo 3 (Lorca-Pascual et al., 2004). Sin embargo, CrgA interactúa con una de las tres proteínas del complejo WC de *M. circinelloides*, MCWC-1b para desencadenar su degradación a través de un mecanismo independiente de ubiquitinación (Silva et al., 2008).

Hay otras similitudes de función entre CrgA y CarS. En primer lugar, tal como se observó en los mutantes *carS* de *Fusarium*, los mutantes *crgA* de *M. circinelloides* mantienen la fotoinducción de la biosíntesis de carotenoides (Navarro et al., 2001). En segundo lugar, ambas proteínas están involucradas en otros procesos además de la carotenogénesis, apuntando a funciones reguladoras más amplias. Esta conclusión se basa en la alteración del crecimiento y la esporulación de los mutantes *crgA* de *M. circinelloides* (Quiles-Rosillo et al., 2003; Murcia-Flores, et al., 2007) y en la producción de bicaverina y giberelinas en los mutantes *carS* de *F. fujikuroi* (Candau et al., 1991; Rodríguez-Ortiz et al., 2009).

El gen *carS* de *F. fujikuroi* es capaz de restaurar la producción basal de carotenoides si se introduce en mutantes *carS* de *F. oxysporum*, aunque no se recuperan totalmente los niveles normales de expresión de los genes estructurales, indicando que su función está conservada en ambas especies (Rodríguez-Ortiz, et al. 2012).

Regulación por factores independientes de la luz y el gen *carS*

La disponibilidad de nitrógeno controla la producción de diferentes metabolitos secundarios en *Fusarium*. Un buen ejemplo es la producción de giberelinas y de bicaverina, inducidas por la ausencia de nitrógeno a través de una compleja red reguladora (Stud y Tudzynski, 2014). Los experimentos con micelio inmovilizado de *F. fujikuroi* incubado con bajas concentraciones de nitrógeno, al cual se le añadió más tarde nitrógeno en exceso, revelaron que la síntesis de carotenoides es más activa en condiciones de hambre de nitrógeno (Garbayo, et al., 2003). El efecto negativo del nitrógeno se confirmó cambiando el medio cultivo del micelio inmovilizado a diferentes concentraciones de nitrógeno y observando que los carotenoides aumentaban o disminuían dependiendo de las condiciones de concentración de nitrógeno, baja o alta respectivamente, indicando que el efecto represor es reversible.

El efecto estimulador de la carotenogénesis bajo condiciones de hambre de nitrógeno en *F. fujikuroi*, tanto a nivel de ARN mensajero como a nivel de carotenoides, es aditivo con el efecto producido por la luz (Rodríguez-Ortiz et al.,

2009), lo que indica mecanismos de acción diferentes. La regulación de la carotenogénesis por nitrógeno se ha descrito también en *N. crassa*, donde los niveles de ARNm de *al-1* y *al-2* (ortólogos de *carRA* y *carB*, respectivamente) aumentan considerablemente en condiciones de escasez de nitrógeno comparado con las condiciones de cultivo estándar de nitrógeno, tanto en la estirpe silvestre como en los mutante ciegos *wc* (Sokolovsky et al., 1992). La regulación por nitrógeno podría estar involucrada en el control de la expresión a nivel de cromatina, como indica la metilación de diferentes histonas encontradas en los genes del *cluster car* en un mutante de metiltransferasa KMT6 en *F. graminearum* (Connolly et al., 2013). En *F. fujikuroi*, la expresión de varios *clusters* de producción de metabolitos secundarios regulados por nitrógeno está asociada a la acetilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9ac) (Wiemann et al., 2013). Esto sugiere un mecanismo similar en la regulación de los genes estructurales *car*, lo cual es tratado en el Capítulo 5 de resultados.

En *N. crassa*, además de la regulación por luz, la síntesis de carotenoides es estimulada en el proceso de la conidiación por un mecanismo independiente de la luz (revisado por Avalos y Corrochano, 2013). En realidad, la conidiación se estimula por la luz y por el desarrollo aéreo en ese hongo, que destaca por la producción masiva de conidios con una pigmentación anaranjada en cultivos de agar. La conidiación es menos abundante en *Fusarium* y la síntesis de carotenoides en los conidios ha sido normalmente ignorada. Una comparación del efecto de la luz en la cantidad de carotenoides en el micelio y en los conidios de colonias en superficie entre la estirpe silvestre y un mutante *carS* de *F. oxysporum* mostró la conservación de la regulación en los conidios por luz y la desregulación en el mutante *carS* (Rodríguez-Ortiz, 2012). La baja cantidad de carotenoides en los conidios de la estirpe silvestre incubada en la oscuridad indica la ausencia de inducción asociada al desarrollo, como se ha descrito en *N. crassa*.

La localización celular de la biosíntesis de carotenoides es un aspecto regulatorio que ha recibido poca atención. A causa de la hidrofobicidad natural de los carotenoides, se asume que interactúan con membranas, pero su distribución subcelular es desconocida en *Fusarium*. Un acercamiento bioquímico basado en el marcaje específico de diferentes terpenoides (mevalonato marcado con ^{14}C) permitió establecer que los carotenoides son producidos en compartimentos celulares diferentes a aquellos donde se sintetizan las giberelinas y los esteroides (Domenech et al., 1996). Actualmente se están realizando experimentos basados en la fusión de proteínas fluorescentes para visualizar la localización física de las enzimas de la biosíntesis de carotenoides en *Fusarium*.

Objetivos

OBJETIVOS

Esta Tesis pretende profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan la ruta biosintética de carotenoides mediante la proteína CarS y por nuevos genes localizados en su entorno genómico. Para ello se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- Investigar la participación de especies de ARN no codificante ligados al gen *carS* en el control de la síntesis de carotenoides.
- Investigar la presencia de nuevos genes reguladores de la síntesis de carotenoides en la región genómica del gen *carS* en *F. oxysporum*.
- Evaluar el grado de especificidad de la acción de la proteína CarS en el transcriptoma de *F. oxysporum*.
- Estudiar si las marcas epigenéticas de la histona H3 juegan un papel en la expresión de genes estructurales y reguladores de la ruta de síntesis de carotenoides.

Material Y Métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Material Biológico

Estirpes de *Fusarium*

Las estirpes de *Fusarium* empleadas en esta Tesis, así como su fenotipo y origen, se describen en la Tabla 1. La estirpe de *Fusarium oxysporum* 4287 (FGSC 99335 en la colección del Fungal Genetic Stock Center, Kansas City, MO, EEUU), fue amablemente cedida por el grupo de los Dres. M.I.G. Roncero y Antonio Di Pietro (Departamento de Genética, Universidad de Córdoba).

Tabla 1. Estirpes de *Fusarium oxysporum* utilizadas en esta Tesis.

Estirpe	Nombre de uso	Mutación	Fenotipo	Referencia
4287	WT		Silvestre	Anaya y Roncero, 1995
SX1	SX1	NG	Naranja intenso	Rodríguez-Ortiz (2012)
SX2	SX2	NG	Naranja intenso	Rodríguez-Ortiz (2012)
93C9	T2	At	Naranja intenso	Rodríguez-Ortiz (2012)
107E6	T3	At	Naranja intenso	Rodríguez-Ortiz (2012)
SX78	$\Delta mir1$ (#2)	Dirigida	Albino	Esta Tesis
SX79	$\Delta mir1$ (#4)	Dirigida	Albino	Esta Tesis
SX80	$\Delta mir2$ (#3)	Dirigida	Albino	Esta Tesis
SX81	$\Delta mir2$ (#4)	Dirigida	Albino	Esta Tesis
SX82	$\Delta carP$	Dirigida	Albino	Esta Tesis
SX83	$\Delta carF$ (#4)	Dirigida	Pálido	Esta Tesis
SX84	$\Delta carF$ (#5)	Dirigida	Pálido	Esta Tesis

Origen: método de obtención a partir de 4287

NG: N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

At: Transformación integrativa mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Dirigida: Deleción por transformación de protoplastos

Silvestre: Naranja en la luz, albino en oscuridad

Pálido: Naranja pálido en la luz, albino en oscuridad

Estirpe de *Escherichia coli*

Se usó rutinariamente la estirpe DH5 α , cuyo genotipo es: *supE44* Δ *lacU169* ϕ 80 *lacZ* Δ M15 *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1* (Hanahan, 1983).

Estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*

Se usó la estirpe FY834 (MAT α *his* Δ 200 *ura3-52* *leu2* Δ 1 *lys* Δ 202 *trp1* Δ 63).

Vectores de clonación y plásmidos

- **pGEM-T easy (Promega A1360):** Plásmido que contiene un gen de resistencia a ampicilina. Está abierto en el sitio de corte de la enzima *EcoRV* y posee en su extremo 3' una cola de timinas para facilitar la clonación de productos de PCR. El lugar de clonación interrumpe el inicio del gen *lacZ* de la β -galactosidasa, permitiendo así la detección de colonias con el plásmido recombinante en placas con medio de selección con ampicilina, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) e IPTG (isopropil- β -D-1- tiogalactopiranosido). El tamaño es de 3 Kb.
- **pHJA2:** (Fernández-Martín et al, 2000). Plásmido derivado de pAN7-1 (Punt et al., 1987) y p-BlueScript[®] II KS + (Stratagene). Este plásmido contiene el gen *hph* de resistencia a higromicina B y un sitio de clonación múltiple (procedente de pAN7-1 y pBlueScript[®], respectivamente). El tamaño es de 7,2 kb.
- **pRS426:** Plásmido proveniente del Fungal Genetics Stocks Center (FGSC). Es un vector de clonación diseñado para la manipulación genética a través del huésped de *S. cerevisiae*, y que también es funcional en *E. coli*. Contiene el gen de resistencia a ampicilina y el gen *URA3* de *S. Cerevisiae*, que se utilizan como marcadores de selección. El tamaño es de 5,7 kb.
- **pCSN44:** Plásmido proveniente del Fungal Genetics Stocks Center, derivado de pDH25 (Cullen et al., 1987). Este plásmido contiene el gen de resistencia a higromicina B bajo control del promotor y el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans*. El tamaño es de 3,4 kb.
- **pLR28:** Plásmido resultante de clonar en pGEM-T easy el producto de PCR (3,4 kb) de la región genómica que contiene al supuesto “*fox-mir1*”, obtenido con los cebadores Foxy-21F y Foxy-22-22R, a partir de ADN genómico de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* 4287 (Rodríguez-Ortiz, 2012). El tamaño es de 6,4 kb.
- **pLR29:** Plásmido resultante de clonar en pGEM-T easy el producto de PCR (2,9 kb) de la región genómica que contiene al supuesto “*fox-mir2*” con los cebadores Foxy-25F-E6-1F y miARN2Fo-1R, utilizando como sustrato ADN genómico de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* 4287 (Rodríguez-Ortiz, 2012). El tamaño es de 5,9 kb.
- **pDul7:** Plásmido utilizado para la delección de “*fox-mir1*”, resultado de ligar el plásmido pRS426 con tres fragmentos independientes obtenidos por PCR: (1) la región 5' de “*fox-mir1*” (cebadores P-Fox-mir1-5F/P-Fox-mir1-5R), (2) la región 3' de “*fox-mir1*” (cebadores T-Fox-mir1-3F/T-Fox-mir1-3R) y (3) el *cassette* de resistencia a higromicina B de pCSN44 (cebadores HPH-6F/HPH-6R). El tamaño es de 9,3 kb.
- **pDul8:** Plásmido utilizado para la delección de “*fox-mir2*”, resultado de ligar el plásmido pRS426 con tres fragmentos independientes obtenidos por PCR:

(1) la región 5' de "fox-mir2", (cebadores P-Fox-mir2-5F/P-Fox-mir2-5R), (2) la región 3' de "fox-mir2" (cebadores T-Fox-mir2-3F/T-Fox-mir2-3R) y (3) el *cassette* de resistencia a higromicina B de pCSN44 (cebadores HPH-6F/HPH-6R). El tamaño es de 8,9 kb.

- **pDul14:** Plásmido utilizado para la delección del gen *carP*, resultado de ligar el plásmido pRS426 con 3 fragmentos independientes obtenidos por PCR: (1) la región 5' de *carP* (cebadores OMP998/OMP999), (2) la región 3' de *carP* (cebadores Fox-ZD-LNC-F/Fox-ZD-LNC-R) y (3) el *cassette* de resistencia a higromicina B de pCSN44 (cebadores HPH-6F/HPH-6R). El tamaño es de 9,8 kb.

- **pDul15:** Plásmido utilizado para la delección del gen *carF*, resultado de ligar el plásmido pRS426 con 3 fragmentos independientes obtenidos por PCR: (1) la región 5' UTR de *carF* (cebadores Fox-ZI-FOXG_09306F/ Fox-ZI-FOXG_09306R), (2) la región 3' UTR de *carF* (cebadores Fox-ZD-FOXG_09306F / Fox-ZD-FOXG_09306R) y (3) el *cassette* de resistencia a higromicina B de pCSN44 (cebadores HPH-6F/HPH-6R). El tamaño es de 10,2 kb.

Medios de cultivo.

Medio de cultivo para *Escherichia coli*.

- Medio LB (Luria-Bertani): Su composición por litro de agua destilada es 10 g de peptona hidrolizada enzimáticamente (USB), 5 g de extracto de levadura, y 5 g de NaCl (Sambrook y Russell, 2001). En caso de medio sólido, se añaden 15 de agar.

Este medio se puede suplementar con 100 mg/l de ampicilina, 50 mg/l de X-Gal y 134 μ M de IPTG para la selección de estirpes resistentes a ampicilina o para detección de actividad β -galactosidasa.

- Medio SOB: Su composición por litro de agua destilada es 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,5 g de NaCl, y 2,5 mM de KCl. Se ajusta a pH 7 con NaOH y se esteriliza. Después de autoclavar se añade $MgCl_2$ a una concentración final 10 mM. Este medio se utiliza para la producción de células competentes de *E. coli*.

Medio de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*.

- Medio YPD: Su composición por litro de agua destilada es 10 g de extracto de levadura, 20 g de bactopectona y 20 g de glucosa. Se le añade 20 g de agar en caso de medio sólido.
- Medio SC mínimo: Su composición por litro de agua destilada es 1,7 g de *Yeast nitrogen base* (carente de aminoácidos y NH_4SO_4 , abreviado YNB), 5 g de NH_4SO_4 y 20 g de glucosa. Se añadieron 20 g de agar en caso de medio

sólido. Este medio se suplementó con los aminoácidos necesarios según el experimento.

Medios de cultivo para *Fusarium oxysporum*.

- **PDB:** *Potato Dextrose Broth*. Hervir 200 g de patatas peladas en 1 l de agua destilada durante 60 minutos. Transcurrido ese tiempo, filtrar, añadir 20 g de glucosa y enrasar con agua destilada hasta 1 l. Alternativamente, se puede emplear un medio comercial (24 g/L de PDB de FORMEDIUM LTD). En el caso de medio sólido, se añade agar 16 g/l. Este medio, que se denomina PDA (*Potato Dextrose Agar*), se utilizó para cultivar *F. oxysporum* con el objetivo de obtener esporas. En caso de crecimiento selectivo se le añadió el antibiótico correspondiente.
- **DGasn:** Se utilizó como medio mínimo para los experimentos de expresión génica. Su composición por litro de agua destilada es 30 g de glucosa, 3 g de L-asparagina, 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 0,5 g KCl y 2ml de solución de microelementos que contienen 10 µg de HBO_4 , 100 µg CuSO_4 , 200 µg FeCl_3 , 20 µg de MnCl_2 , NaMoO_4 y 2 mg de ZnSO_4 .
- **Medio YPED-2G:** Medio utilizado para la germinación de los conidios en el protocolo de preparación de protoplastos. Su composición por litro de agua destilada es 3 g de extracto de levadura, 10 g de peptona y 20 g de glucosa.
- **Medio de regeneración de protoplastos:** su composición por litro de agua destilada es 2 g de extracto de levadura, 2 g de NZ amina y 16 g de agar. El medio se prepara 2 veces concentrado y tras autoclavarlo se le añade el mismo volumen de sacarosa 1,6 M para obtener una concentración final de 0,8 M.
- **Medio de regeneración de cobertera:** Este medio se utilizó para sembrar los protoplastos en cajas de Petri de medio de regeneración de protoplastos. Su composición es igual al del medio de regeneración salvo que éste lleva 20 g de agarosa por litro en lugar de agar. La sacarosa se le añade después de autoclavar.

Métodos

Crecimiento y mantenimiento de microorganismos

Condiciones de cultivo para *Escherichia coli*

Las bacterias *E. coli* se cultivaron en LB a 37°C, en agitación a 200 rpm en el caso de medio líquido. Cuando era necesario, se añadió el antibiótico requerido (ampicilina generalmente) y/u otros compuestos, como el X-Gal e IPTG.

La conservación de las estirpes bacterianas durante largos períodos de tiempo se llevó a cabo en medio LB con 30% glicerol (v/v) a -80°C. Para períodos cortos se mantuvieron colonias en agar en frigorífico.

Condiciones de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*

Como regla general, *S. cerevisiae* se cultivó en YPD sólido para refrescar estirpes de colección o en YPD líquido para obtener biomasa suficiente como pre-inóculos. En los experimentos de transformación se utiliza el medio mínimo SC con los aminoácidos y bases correspondientes (0,03% L-isoleucina, 0,15% L-valina, 0,02% L-arginina-HCl, 0,03% L-lisina-HCl, 0,02% L-metionina, 0,05% L-fenilalanina, 0,2% L-treonina, 0,02% L-triptófano, 0,03% L-tirosina, 0,02% L-histidina HCl monohidratada, 0,1% leucina, 0,1% L-ácido glutámico, 0,1% L-ácido aspártico, 0,4% L-serina y 0,02% L-adenina hemisulfato). Este medio no se complementa con uracilo, ya que se utiliza como requerimiento de selección en el que el crecimiento sólo se permite si las células son capaces de producir uracilo. El plásmido pRS426, que se utiliza en la transformación de *S. cerevisiae*, posee el gen *URA3*, que permite complementar la mutación de la estirpe auxótrofa de uracilo empleada en la transformación.

Condiciones de cultivo para *Fusarium oxysporum*

- Generalmente se usó medio PDB para la esporulación y la obtención de micelio. Las estirpes se cultivaron durante 3-4 días en agitación a 200 rpm a 30°C, en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo, inoculado con 10⁸ esporas. Las esporas se recogieron a través de un filtro (Monodur 10-15 µm) y se mantuvieron congeladas en glicerol al 30% a -80°C.
- Para refrescar estirpes o sacarlas de colección se usó el medio PDA.
- El medio empleado para el resto de los experimentos de esta Tesis fue DGasn.
 - Para los ensayos de expresión génica: Se emplearon cajas de Petri de 150 mm de diámetro con 80 ml medio líquido inoculadas con 10⁶ esporas frescas. Las cajas se mantuvieron estáticamente a 30°C con los requerimientos específicos de cada experimento. Los cultivos en oscuridad se incubaron dentro de cajas de cartón (31cm x 23cm x 22cm) envueltas en papel de aluminio para impedir el paso de la luz. Los cultivos en la luz se realizaron bajo una plataforma con 4 tubos fluorescentes que aportaban una intensidad lumínica de 7,2 w/m² (432 Lm/w).
 - Para los ensayos de producción de carotenoides: Se emplearon las cajas de Petri standard de 90 cm de diámetro, con 25 ml medio sólido. Las cajas se incubaron a 30°C con los requerimientos de luz/oscuridad pertinentes de la misma forma que en el resto de ensayos en medio líquido. En este caso los cultivos se inocularon mediante 7 pinchazos con palillos estériles por cada caja de Petri a partir de colonias frescas aisladas.

- Para los experimentos de coimmunoprecipitación: Los cultivos se incubaron en cajas de Petri de 150 mm con 80 ml de medio DGasn líquido, inoculados con 10^6 esporas. Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 3 días en oscuridad y posteriormente se expusieron a la luz durante 1 hora o durante otros tiempos dependiendo del experimento

Aislamiento de ácidos nucleicos.

Purificación de ADN plasmídico de *Escherichia coli*.

Para la obtención de ADN plasmídico se utilizaron dos métodos diferentes dependiendo de la calidad y pureza que se se quiera obtener.

- Método ordinario (>10 µg): Se empleó el protocolo basado en la lisis alcalina (Stephen et al., 1990; Sambrook et al., 2001) con algunas modificaciones. Se inocularon 3 ml de LB con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C durante 8-12 horas en agitación a 200 rpm. Se tomaron 1,5 ml del cultivo y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 150 µl de la Solución I (Tris 50 mM; EDTA 10 mM; ARNasa 10 mg/l, mantenida siempre en frío). Después las células se lisaron con 150 µl de la Solución II (NaOH 10 N; SDS 10%), la mezcla se mantuvo en hielo durante unos minutos y finalmente se neutralizó con la Solución III (acetato potásico 5 M; ácido acético glacial 11% v/v). Se centrifugó 10 minutos en una centrífuga para tubos *ependorf* a 13.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Para precipitar el ADN plasmídico contenido en el sobrenadante se añadieron 500 µl de isopropanol o de etanol 96°, se mantuvo en hielo durante 30 minutos y se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm. Para lavar el precipitado se añadieron 200 µl de etanol 70% (v/v), y se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado. La muestra se resuspendió en 50 µl TE (Tampón Tris-EDTA, TrisHCl 20 mM pH 8; EDTA 10 mM) o H₂O desionizada.
- Kit comercial (<10 µg): Solo se utilizó cuando se necesitaba ADN plasmídico de alta pureza, por ejemplo, para secuenciación. El kit comercial utilizado fue *Nucleo Spin Plasmid* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de ADN plasmídico de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la purificación de ADN plasmídico de *S. cerevisiae* se utilizó un protocolo similar al de extracción de ADN plasmídico de bacterias, cambiando algunas soluciones. Se partió de biomasa obtenida a partir de un preinóculo e incubada durante 10-12 horas en medio selectivo. Las células se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm y se resuspendieron en agua para lavarlas. A continuación se volvieron a centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm y se resuspendió el precipitado en 640 µl de una solución de Sorbitol 0.9 M y EDTA 0.1 M pH 8. A esta mezcla se le añadieron 6.4 µl de β-mercaptoetanol y 10 µl de zimoliasa 20T (10 mg/ml), cóctel enzimático para romper

la pared celular de las levaduras, y se incubó durante 1 hora a 37°C. A continuación se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm y se continuó con el protocolo de extracción de plásmido de bacterias descrito anteriormente.

Extracción de ADN de *Fusarium oxysporum*

Se hicieron dos tipos de extracciones dependiendo de la cantidad de ADN a obtener.

- Pequeña escala (<10 µg ADN): Se utilizó el kit comercial *Nucleo Spin Plant II* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante en su apartado 5.2 ("Genomic DNA from fungi").
- Gran escala (>10 µg ADN): Se trituraron unos 2 g de micelio en un mortero con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se resuspendió en 7 ml de Solución de Extracción (Tris-HCl 50 mM; EDTA 20 mM, pH 7,5). Las muestras se mantuvieron en hielo y se les añadió 0,5 ml de SDS 10%, mezclando suavemente. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 65°C, se añadieron 2 ml de solución neutralizante (acetato potásico 5M), se enfrió en hielo durante 30-60 minutos y se centrifugó 10 minutos a 4.500 rpm a 4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo de 50 ml y se añadieron 2 volúmenes de etanol 96° para precipitar el ADN. El tubo se mantuvo una hora a -80°C y se centrifugó durante 30 minutos a 4.500 rpm a 4°C. El precipitado se lavó con 1 volumen de etanol 70% (v/v) y el ADN se resuspendió en 3 ml de TE. Para eliminar el ARN se trató la muestra con ARNasa durante 30 minutos a 37°C y se volvió a precipitar el ADN con 1 volumen de Isopropanol, tras lo cual le siguió un lavado con etanol 70% (v/v). Este precipitado se resuspendió en 1 ml de TE. En los casos necesarios se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó para eliminar los restos orgánicos y proteicos. Se recuperó la fase acuosa (situada arriba), a la que se añadió 1 volumen de cloroformo y se volvió a recuperar la fase acuosa. De nuevo se precipitó con 2 volúmenes de etanol 96° y se lavó con etanol 70% (v/v). El ADN se resuspendió en 500 µl de TE y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Extracción de ARN de *Fusarium oxysporum*

La extracción de ARN también tiene dos variantes según la cantidad y/o pureza necesaria para su uso.

- Pequeña escala (<40 µg ADN): Se utilizó el kit comercial RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso la pureza del producto es muy alta.
- Gran escala (>50 µg ADN): Se utilizó el reactivo químico comercial TRIzol (TRIzol Reagent, Ambion). Se trituraron al menos 150 mg de micelio en mortero al igual que para extracción de ADN. El protocolo se hizo siempre en hielo para evitar la degradación del ARN. El polvo obtenido se resuspendió en 750 µl de TRIzol, se homogeneizó la muestra y se mantuvo en frío durante 5 minutos. Se añadieron 150

µl de cloroformo, se agitó vigorosamente en vórtex durante 15 segundos y se mantuvo durante 2-3 minutos en hielo. Después se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se retiró la fase acuosa y se pasó a un tubo limpio, al que se añadieron 375 µl de isopropanol. Tras mezclar bien, se incubó en frío durante 10 minutos, se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C, y se retiró el sobrenadante con cuidado de no tocar el precipitado. Luego se lavó con etanol 70%, se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Una vez seco se resuspendió en H₂O libre de ARNasa. Se incubó en un baño a 60°C durante 10-15 minutos y se guardó la muestra a -80°C hasta su uso.

Este método de extracción de ARN también se utilizó para la secuenciación de ARN (RNA-Seq), ya que proporciona grandes cantidades de ARN en poco volumen, condición exigida por la empresa que lleva a cabo la secuenciación masiva. En este caso hubo un paso adicional de purificación de ARN: al final del proceso, la muestra de ARN se pasó 2 veces por una columna de purificación de ARN del kit comercial NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) siguiendo las indicaciones del fabricante, obteniendo finalmente un ARN de calidad suficiente para el proceso de RNA-Seq.

Manipulación de ácidos nucleicos

Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La separación e identificación de moléculas de ADN y ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8). La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos a separar, oscilando entre 0,7% (p/v) para electroforesis de rutina y 2% (p/v) para diferenciar tamaños inferiores a 200 pb. Para visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con radiación ultravioleta se añadió bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Cada muestra se mezcló con un tampón de carga comercial (*Loading buffer* de Takara 10X) en el caso de ADN y un tampón de carga especial (Tampón stock ARN 10X; EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0,25% p/v y glicerol al 50% v/v) en el caso de ARN para evitar su degradación. La electroforesis se realizó en una cubeta horizontal con tampón TAE a un voltaje constante de 1-4 V/cm. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó con un marcador de tamaño comercial (1kb *DNA Ladder* de Nippon Genetics), que contiene fragmentos desde 250 pb a 10 kb.

Recuperación de fragmentos de ADN en geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa se realizó empleando el kit comercial *ISOLATE II PCR and Gel Kit* de Bioline, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tratamientos enzimáticos de ácidos nucleicos

Tratamientos con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas para digerir el ADN fueron suministradas por *Takara* y *New England Biolabs*. Los tratamientos del ADN con una enzima de restricción se realizaron con el tampón y la temperatura de incubación recomendados por el fabricante. Se empleó siempre al menos una unidad de enzima por cada μg de ADN que se quiera digerir. Las enzimas se inactivaron según las instrucciones del fabricante, generalmente por tratamiento a 65°C .

Clonación de fragmentos de ADN en vectores

Para clonar fragmentos de ADN amplificados por PCR, se empleó el plásmido comercial pGEM[®]-T Easy (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera rutinaria antes de la clonación, los fragmentos se precipitaron con acetato de sodio y etanol (descrito en Precipitación de ADN) o se purificaron utilizando el kit comercial *ISOLATE II PCR and Gel Kit* (Bioline), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de las muestras de ADN o ARN se determinaron por densidad óptica a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop[®] ND-1000. En algunas ocasiones la cuantificación se llevó a cabo por comparación de la intensidad de las bandas con cantidades conocidas del marcador de tamaño 1kb *DNA Ladder* de Nippon Genetics tras electroforesis en gel de agarosa.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

PCR estándar

Según la finalidad del experimento, para la amplificación de fragmentos de ADN se emplearon diferentes polimerasas termoestables: *BIOTAQTM DNA polymerase* (Bioline) para las comprobaciones de rutina, *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) para la construcción de vectores y *Velocity DNA polymerase* (Bioline) para construcción de vectores cuando los productos tienen un tamaño superior a 8 kb. Se utilizaron las condiciones de reacción fueron las indicadas en las instrucciones de uso del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo con una cantidad de ADN molde que osciló entre 10 y 50 ng para ADN genómico y entre 1 y 10 ng para ADN plasmídico. Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 2.

Transcripción inversa del ARN (RT-PCR)

Se realizó en dos pasos: primero se eliminaron los restos de ADN en las muestras de ARN y luego se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc).

- Para eliminar los restos de ADN se utilizó el kit *Recom DNase RNase-free* (USB). Generalmente se partió de 2.450 ng de ARN total (7 μ l de una solución de 350 ng/ μ l). El kit incluye un tratamiento con ADNasa durante 15 minutos a 30°C, a razón de 0,1 μ g/ μ l de ARN y 0,1 U/ μ l de enzima. Para detener la reacción se incubó la mezcla a 65°C con una solución de EDTA incluida en el kit.
- Para la síntesis de ADNc, el ARN tratado con ADNasa se sometió a una transcripción inversa mediante el kit *Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Para analizar la dirección del transcrito del gen *carP* se utilizó una variante de este protocolo. La modificación consiste en sustituir el cebador poliT, usado en la síntesis de ADNc común, por una mezcla de cebadores específicos para cada una de las cadenas, de manera que solo se obtiene el sustrato de ADNc correspondiente a la orientación del transcrito. Cada mezcla de cebadores está compuesta por 4 cebadores diferente, de unos 20 pb, que cubren distintas partes del transcrito en una sola orientación. Posteriormente, se realiza una PCR con ambos sustratos y solo se espera que sea visible el producto de PCR en el sustrato generado por la mezcla de cebadores complementarios a la orientación del transcrito.

Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

La expresión de los genes de *F. oxysporum* se detectó mediante RT-qPCR. Para ello se utilizó como molde el ADNc obtenido a partir de ARN con las parejas de cebadores apropiadas y se amplificaron productos con una longitud de entre 150 y 200 pb. Estos ensayos se llevaron a cabo en dos pasos con el kit *Light cycler SYBR Green Master I* (Roche). Se utilizaron 50 ng de ARN a una concentración de 25 ng/ μ l. La muestra se mezcló con 0.4 μ M de los cebadores directo y reverso, 5 μ l de 1xSYBR Green I Master, que incluye polimerasa Taq, tampón de reacción, dNTPs, y MgCl₂. El volumen final de muestra por pocillo fue de 10 μ l. El programa usado para la amplificación del ADNc consistió en una pre-incubación de 5 minutos a 95°C, y 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 10 segundos a 72°C. Los cebadores utilizados se diseñaron con el programa *Primer Express*TM V2.0.0 (Applied Biosystems) y se sintetizaron en la empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Bélgica). Los cebadores que se utilizaron en los análisis se describen en la Tabla 2.

Para cada muestra de ADNc se realizaron 3 réplicas técnicas simultáneas. La reacción de amplificación se lleva a cabo en placas de 384 pocillos con el equipo RT-PCR LightCycler 480 (Roche). Para analizar los productos obtenidos tras la PCR se

realizaron las curvas de desnaturalización (curvas de *melting*). Para ello se programó el equipo para aumentos de 0,5°C cada 5 segundos, comenzando a los 55°C hasta alcanzar los 95°C, determinándose la fluorescencia tras cada aumento de temperatura.

Los niveles relativos de productos de RT-qPCR se determinaron usando el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), siendo los valores de C_t normalizados según el valor C_t obtenido para el gen de la tubulina usado como gen de referencia endógena. Para ello se aplicó la ecuación:

$$\text{Expresión relativa (RE)} = 2^{-(C_t \text{ gen} - C_t \text{ tubulina})}$$

Tabla 2. Cebadores utilizados en este trabajo.

Cebador (Nombre)	Número colección	Secuencia 5'-3'	Uso experimental
ChIP-QPCR-carB-1F	OMP-1037	CTGAACGAGGCGCAGTTAAT	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carB-1R	OMP-1038	CATTTTGACAGCACCACCAC	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carB-2F	OMP-1039	GGTTTGGTTTGGAGGGTTTT	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carB-2R	OMP-1040	GTTGGAATTTGCTTGGCATC	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carF/carP-3F	OMP-1045	AGGTTCAAAATGGGGCTCTT	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carF/carP-3R	OMP-1046	GGCATTGATTCTTCGCTTA	qPCR-ChIP
ChIP-Promo-Tub-3F	OMP-1185	GGCGATACTTCACATACTGGGC	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carRA/carX-1F	OMP-1051	TGTGTGACGGCATAACGAGAT	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carRA/carX-1R	OMP-1052	GAGGGTGTAGTGGGGTAGCA	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carRA/carX-2F	OMP-1053	GCTACCCCACTACACCCTCA	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carRA/carX-2R	OMP-1054	TCACGGTAACGGCAATATCA	qPCR-ChIP
ChIP-Promo-Tub-3R	OMP-1186	CCCGCAGTGGCAGGCACGCC	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carS-3F	OMP-1061	CCCTGTGAGAAATCCAGAA	qPCR-ChIP
ChIP-QPCR-carS-3R	OMP-1062	CATCTCCGTTGTGTGAATCG	qPCR-ChIP
ChIP-Telom-Cnegativo-3F	OMP-1191	GCGCGTGCAGCGTCGTGACG T	qPCR-ChIP
ChIP-Telom-Cnegativo-3R	OMP-1192	CACAAGCTTATGTCTGCAACGG	qPCR-ChIP
Foxy-2R-carS	OX4	TCCTCGAGGCTAACATCGTC	RT-PCR
Foxy-3F-carS	OX5	CCTTGACGGATACATCGTCG	RT-PCR
Tub-2F	VAR-27	CCGGTGCTGGAAACAACCTG	RT-PCR
Tub-2R	VAR-28	CGAGGACCTGGTCGACAAGT	RT-PCR
RTFoxyA-2F-carRA	VAR-67	CATCCAGCGCGAAGTTGTC	RT-PCR
RTFoxyA-2R-carRA	VAR-68	CGCGCGATATTGACGTATTG	RT-PCR
RTFoxyA-3F-carB	VAR-69	CCATGTGAAGGGAGTGTTGATG	RT-PCR
RTFoxyA-3R-carB	VAR-70	CCATGTGAAGGGAGTGTTGATG	RT-PCR
RTFoxy-7F-carF	VAR-77	GCAGCTTCAGGGCCAGAA	RT-PCR
RTFoxy-7R-carF	VAR-78	TGGTGCAAAAGTTCAGCATCCT	RT-PCR
RT-Fox-carX-1F	VAR-343	CTTCCCGCGGCATCAA	RT-PCR

RT-Fox-carX-1R	VAR-344	ACAGCATGGCGCTGTATGAA	RT-PCR
RT-Fox-carD-1F	VAR-345	GATGAGCCTGTCCCAATGT	RT-PCR
RT-Fox-carD-1R	VAR-346	GCGAGTGCGGTGCTTCA	RT-PCR
RT-Fox-carO-1F	VAR-347	GCTCGTCTGCACGCTAAACA	RT-PCR
RT-Fox-carO-1R	VAR-348	CGCACATGACAAAGGTTCTGA	RT-PCR
RT-Fox-carT-1F	VAR-349	TGCGCTTTTGGCGAATGT	RT-PCR
RT-Fox-carT-1R	VAR-350	TCGACACCTCCGTCTTCTCAT	RT-PCR
RT-TDulA-F-carP	VAR-391	TGCGGACCGTCCAAGAGT	RT-PCR/PCR
RT-TDulA-R-carP	VAR-392	CGCCGATCTTGCTCTTGTTT	RT-PCR/PCR
RT-Fox-cryD-1F	VAR-393	CACCTCAGGAACCTCCGTTTC	RT-PCR
RT-Fox-cryD-1R	VAR-394	ATAGGCTGGAGGGTCTTGCA	RT-PCR
RT-Fox-vvdA-1F	VAR-395	GTACGGACAAGGTCGCTTAC	RT-PCR
RT-Fox-vvdA-1R	VAR-396	GAAGGGCTGGCCATATTTCTT	RT-PCR
RT-Fox-wcoA-1F	VAR-397	AGTAACGGCACCGAAAACCA	RT-PCR
RT-Fox-wcoA-1R	VAR-398	TTGTCCTCTGAGGCCAAAGC	RT-PCR
RT-Fox-con10-1F	VAR-399	CTCTTTTGAGCCTGGTAGTGAGAAG	RT-PCR
RT-Fox-con10-1R	VAR-400	CATCGATCCAAAGTCATGTCTCAT	RT-PCR
RT-Foxg_08913-1F	VAR-401	GGCGAAGCGAGTGTGATTCT	RT-PCR
RT-Foxg_08913-1R	VAR-402	GAAAGGACTGGTGGCATCAAC	RT-PCR
RT-Foxg_10652-1F	VAR-403	GGGCCAGTGGTCTCGAATAA	RT-PCR
RT-Foxg_10652-1R	VAR-404	TTGGTCAAATGGCAGGTGTCT	RT-PCR
miARN2-Fo-1R	OMP-640	CCAGAAGTAAGTAGTGTTC	PCR_mir2
HPH-6F	OMP-692	GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC	PCR_HygR
HPH-6R	OMP-693	GTTGGAGATTTAGTAACGTTAAGTGGAT	PCR_HygR
PCR-mir2-07-1R	OMP-826	GTGTAGAGATTGGTGGGGGTT	PCR_mir2
Tub-oxy-1F	OMP-842	AGGTCATTAGCATCAACGTTG	PCR_Tubulina
Tub-oxy-1R	OMP-843	AGAAAGTGAAGACCATGCCTC	PCR_Tubulina
P-Fox-mir1-5F	OMP-897	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAACGATTGTGATG GTACGTGTGCA	PCR_mir1
P-Fox-mir1-5R	OMP-898	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACAAGCTCTCTCT GATCTGATT	PCR_mir1
T-Fox-mir1-3F	OMP-899	CTCCTTCAATATCATCTTGTCTCCGACAAGAAGGGTCC TGGGGTATGG	PCR_mir1
T-Fox-mir1-3R	OMP-900	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCAGAATGCAG GGTTCTCAGTGAA	PCR_mir1
P-Fox-mir2-5F	OMP-901	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGATGACAAGT GCAAGGCTTGA	PCR_mir2
P-Fox-mir2-5R	OMP-902	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACCCCTCACTCAT CTCGATAATCG	PCR_mir2
T-Fox-mir2-3F	OMP-903	CTCCTTCAATATCATCTTGTCTCCGACGTAGAGTAACG ACCACCTCC	PCR_mir2
T-Fox-mir2-3R	OMP-904	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCAAAAGGGGT TGTATAAGGTAGG	PCR_mir2
Foxy-39R	OMP-945	GCCAATCCATTTCTCAACCT	PCR_southern_ mir1
Foxy-41R	OMP-948	TACTCCTTGAGCAGCGGGAA	PCR_southern_ mir2
Foxy-48F	OMP-987	AGTAGCGTCGATGTGCCAGTTG	PCR_carP

Foxy-48R	OMP-988	TTTAGACGCCTCCAGTCTAAGC	PCR_carP
Fox-ZI-Foxg_09306-F	OMP-994	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGTCTTCATAC CTAACAAACCA	PCR_carF
Fox-ZI-Foxg_09306-R	OMP-995	ATCCATTAAACGTTACTGAAATCTCCAACACACCGTGACA GATTCTGTGAG	PCR_carF
Fox-ZD-Foxg_09306-F	OMP-996	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACGGGTGTGTGAG TATTTGGTAT	PCR_carF
Fox-ZD-Foxg_09306-R	OMP-997	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCATCTTTTTTG CCTTCTAACAC	PCR_carF
Fox-ZI-LNC-F	OMP-998	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTGAATAACGG AATTGCCTAGA	PCR_carP
Fox-ZI-LNC-R	OMP-999	ATCCAATTAACGTTACTGAAATCTCCAAGTAGTTGAGAG GGAAACCTGCC	PCR_carP
Fox-ZD-LNC-F	OMP-1000	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACAGAGTAACGAC CACCTCCAC	PCR_carP
Fox-ZD-LNC-R	OMP-1001	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGGGGCGAGTG AGCAGATCTGAC	PCR_carP
Sonda-Foxg-1F	OMP-1029	GAAACATCGGTCGTGACTTACC	PCR_southern_ carF
Sonda-Foxg-1R	OMP-1030	TGCCTCCCGTCCCATTTGTCC	PCR_southern_ carF
Sonda-carP-1F	OMP-1031	CACGCTATCAACGGCTACGCC	PCR_southern_ carP
Sonda-carP-1R	OMP-1032	TTGAGTCGTTACTCTTCGTTGTGTC	PCR_southern_ carP
Foxy-6F	OX10	GAGTCGAGAGAGAAGCGAGA	PCR_mir2
Foxy-7F	OX11	GCCTCTAATAATCATCGGGA	PCR_pDul7
Foxy-21F	OX33	CCGATATGGTCTGTTTATGACG	PCR_pLR28
Foxy-22F	OX35	CCATTTCTCTCTAACCGTCC	PCR_mir1
Foxy-23R	OX37	GCATCATCGTTCTCTCAAGC	PCR_mir1
Foxy-22-22-R	OX38	CCTTCTCATAGCGTAACCG	PCR_pLR28
Foxy-25F-E6-1F	OX41	GCTTGAGAGAACGATGATGC	PCR_pR29

Precipitación de ADN

En diferentes protocolos fue necesario llevar a cabo la precipitación del ADN. Típicamente, se usó para eliminar el tampón, la polimerasa y los dNTPs sobrantes de una PCR, o para aumentar la concentración de ADN de una muestra.

La precipitación rutinaria de ADN se lleva a cabo añadiendo 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol 96° frío. Se incubó a -20°C durante 30 minutos y se centrifugó durante 30 minutos a 13.000 rpm. Se elimina el sobrenadante, se lava con etanol 70% (v/v) y se deja secar el precipitado. Finalmente, se resuspende en agua desionizada en el volumen deseado.

Hibridación de ácidos nucleicos

Hibridación de *Southern*

Para los análisis de *Southern*, una cantidad superior 10 µg de ADN genómico se digirió con las enzimas de restricción adecuadas y los productos resultantes se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. La duración de la electroforesis

osciló entre 4 y 10 horas con un voltaje entre 20 y 60 Voltios. Una vez terminada la electroforesis, se fotografió el gel y se pasó a desnaturalizar el ADN y a su posterior hibridación.

Los tratamientos del gel se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave. Primero se sometió a una depurinización ácida (hidrólisis parcial) sumergiendo el gel en HCl 0,25 M con dos lavados consecutivos de 15 minutos, lavando a continuación con agua. Posteriormente se realizó una desnaturalización alcalina en NaOH 3 M NaCl 1.5 M dos veces durante 15 minutos. Finalmente, se neutralizó el ADN sumergiendo el gel en una solución Tris 0.5 M NaCl 3 M pH 7,5 dos veces durante 15 minutos.

A continuación, el ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Hybond-N de Amersham). La transferencia se llevó a cabo en una bandeja conteniendo tampón SSC 20x (NaCl 3 M y citrato sódico 0,3 M pH 7) en la que se colocaron por orden:

- Una bandeja de electroforesis invertida
- Un papel de filtro cortado al mismo tamaño que el largo de la bandeja y el ancho del gel, de forma que cubra la bandeja completamente y quede siempre humedecido en SSC 20x
- 3 piezas de papel Whatman 3 MM, humedecidas en SSC 20x
- El gel de agarosa con las muestras de ADN genómico tratado
- Membrana de nailon
- 3 piezas de papel Whatman 3 MM, mojadas en SSC 20x
- 3 piezas de papel Whatman 3 MM, secas.
- Una pila de papel de filtro seco
- Una placa de cristal con un peso aproximado de 0,5 kg
- Un nivel para mantener siempre equilibrado el montaje.

En la medida de lo posible se evitaron las burbujas de aire que pudieran quedar entre el papel Whatman 3MM y el gel, o entre el gel y la membrana de nailon. La transferencia se prolongó durante al menos 12 horas a temperatura ambiente.

Finalmente, la membrana se lavó con SSC 2x, se puso sobre papel Whatman 3 MM y se dejó secar en la campana durante 5-10 minutos. Para fijar el ADN a la membrana, se irradió la superficie de cada cara durante 1 minuto a 700 J/m² de radiación ultravioleta con un equipo *Cross-linker* RPN 2500 (Amersham).

- **Preparación de la sonda:** Una vez obtenido el fragmento de ADN genómico para utilizar como sonda, se diluyeron 200 ng en un volumen de 15 µl, se calentó a 100°C durante 10 minutos para su desnaturalización y se enfrió inmediatamente en hielo. A continuación se añadieron 2 µl de una solución de dATP, dGTP, dTTP a 0,5 mM, 2 µl de hexanucleótidos 10x y 1 µl de Klenow. Se añadieron por último 2-4 µl de dCTP (en función de su actividad) marcado radiactivamente con P^{32} . Esta mezcla se

incubó a 37°C durante 3-4 horas en un termobloque. A continuación la sonda se limpió con el kit *GE Healthcare*, y se resuspendió en un volumen de 50 µl. La sonda marcada se calentó durante 5 minutos a 100 °C y se enfrió en hielo.

- **Hibridación:** La membrana se pre-incubó con una solución de prehibridación (Na_2HPO_4 0,5 M, SDS 7% p/v) sin sonda durante al menos 30 minutos a 65°C, pudiendo estar en esas condiciones durante el tiempo de preparación de la sonda. Una vez desnaturalizada la sonda marcada, se añadió a la solución de hibridación y se incubó toda la noche a 65°C en un horno de hibridación (HB-1000 Hybridizer, UVP). Pasado el tiempo de incubación con la sonda, ésta se retiró y se lavó la membrana con la solución de lavado (SSPE 20x*, SDS 0,5%, EDTA 5mM) precalentada a 55°C, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se volvió a lavar con solución de lavado durante 1 hora a 65°C, se retiró la solución y se comprobó la radiactividad de la membrana y los bordes con un contador Geiger (ThermoScientific).

* SSPE 20x: NaCl 3M, NaH_2PO_4 0,25 M, EDTA 0,03M

- **Detección:** Para la visualización de las señales radiactivas en la membrana se empleó un equipo FujiFilm modelo FLA 5100 (Life Science), que permite la captación y análisis de imágenes proveniente de muestras marcadas tanto con isótopos radiactivos, como con agentes fluorescentes o quimioluminiscentes.

Hibridación *northern*

La técnica de *northern* es similar a la técnica de *Southern* con algunas diferencias. En este caso se empleó ARN, una cantidad superior a 10 µg de ARN. El tampón de electroforesis de *northern* es MOPS, se preparó a partir de un stock de MOPS 10x en H_2O con DEPC, que contiene MOPS 8,4% (p/v), Acetato de Sodio 0,1 M y EDTA 0,01 M. En esta técnica es importante que todo el material a utilizar esté libre de ARNasa, por lo cual se trata previamente con NaOH 0,4 N durante 12-14 horas.

El gel de electroforesis lleva 1% de agarosa en tampón MOPS y formaldehído al 2%. Este gel corre aproximadamente 15 minutos a 75 V antes de cargar las muestras.

El tampón de carga utilizado para ARN es una mezcla que se prepara diluyendo una solución 10X que contiene EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 2,5 g/l (p/v) y glicerol al 50% (v/v).

Las muestras se prepararon en un volumen final de 20 µl: 4,5 µl de ARN (10 µg de ARN aproximadamente), 2 µl de MOPS 10x, 3,5 µl de formaldehído 12,3 M y 10 µl formamida. Las muestras se calentaron a 65°C durante 15 minutos, y se les añadió el tampón de carga. La electroforesis tuvo una duración de 4-5 horas a 75 V.

El procesamiento del gel consistió en un lavado de 5 minutos con H₂O, un lavado de 20 minutos con NaOH 50 mM, NaCl 10 mM, seguido de otro lavado de 20 minutos con Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y un último lavado con SSC 20x durante otros 20 minutos.

La transferencia y la fijación del ARN a la membrana se realizó igual que en la técnica de *Southern*. En el caso de *northern*, el filtro se tiñió con azul de metileno 0,02 % en acetato sódico 0,3 M pH 5.5 para visualizar que el ARN se había transferido a la membrana, visualizando los ARN ribosómicos en la membrana. La decoloración se hizo rápidamente con agua. Como sonda se empleó una Ribosonda de ARN marcada con dUTP P³² radiactivo. La hibridación y detección fue igual que en la técnica de *Southern*.

Transformación genética

Transformación de *Escherichia coli*

Para obtener y transformar células competentes se empleó el método descrito por Inoue y colaboradores (Sambrook, 1989).

- **Preparación de células competentes de *E. coli*:** Se cultivó un inóculo de *E. coli* (*DH5α*) en medio LB entre 10-12 horas a 37°C en agitación. A continuación se hizo una dilución de este cultivo en LB para obtener una densidad óptica de 0,1 a 600 nm y se incubó de nuevo a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3-0,4. Posteriormente, se recogió todo el cultivo en tubos *Falcon* de 50 ml, se mantuvo 10 minutos en hielo, y se centrifugó durante 7 minutos a 4.500 rpm a 4°C. Luego se retiró el sobrenadante, se dejó el tubo boca abajo durante 10 min a temperatura ambiente, se resuspendió en 1/5 del volumen inicial en CaCl₂ 0,1 M frío y esta mezcla se mantuvo durante 10 minutos a 0°C. Después se volvió a centrifugar durante 7 minutos a 4.500 rpm a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1/25 del volumen inicial en CaCl₂ 0,1 M frío y glicerol 50%. Las células se alicuotaron en tubos de 100 µl, y se usaron directamente o se almacenaron a -80°C.
- **Transformación de células competentes de *E. coli*:** Se añadió el ADN (<50 ng en un máximo de 10 µl) a 100 µl de células competentes y se mezcló con agitación suave. A continuación se mantuvo durante 30 minutos en hielo, se sometió a un choque térmico de 90 segundos a 42°C y se pasó nuevamente a hielo durante 1-2 minutos. Después se añadieron 400 µl de LB y se incubó durante 45 minutos en agitación suave a 37°C. Finalmente se centrifugó y se sembró a diferentes cantidades en cajas de LB con el antibiótico correspondiente.

Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó el protocolo descrito por Gietz y Woods (2002), con algunas modificaciones.

- **Preparación de las células competentes:** Las células se obtuvieron a partir de un preinóculo incubado durante 12-14 horas en medio YPD. Tras esta incubación, el preinóculo se usó para inocular cultivos de 100 ml de YPD que crecieron hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5-0,6. Las células así obtenidas se centrifugaron y lavaron con H₂O estéril y seguidamente con una solución de acetato de litio 100 mM en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5). Tras la nueva centrifugación, se volvieron a resuspender en 2 ml de la misma solución y se mantuvieron a 30°C durante 1 hora en agitación a 200 rpm.
- **Transformación de las células competentes:** Para cada transformación se mezclaron 150 µl de células competentes, 500 µl de polietilenglicol (PEG) 3350 al 50% en acetato de litio 0,1 M, 10 µl de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) y 10 µl del ADN con el que se desea transformar. La mezcla se mantuvo a 30°C durante 30 minutos en agitación, tras lo cual se sometieron a choque térmico a 42°C durante 20 minutos. Finalmente las células se lavaron con H₂O, se sembraron diferentes diluciones en cajas de Petri con medio de cultivo selectivo con los requerimientos adecuados y se incubaron a 30°C. A partir del 4º día de crecimiento ya se podían observar las colonias transformantes.

Transformación de *Fusarium oxysporum*

Obtención de protoplastos

Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Powell y Kistler (1990), con algunas modificaciones. Se inocularon esporas del hongo procedentes de suspensiones congeladas en glicerol en 100 ml de medio PDB y se cultivaron 3-5 días a 30°C en agitación a 200 rpm. Transcurrido este tiempo se recogieron las nuevas esporas por filtración y se inocularon $5 \cdot 10^8$ esporas en 100 ml de YPED-2G. Tras 10-12 horas de incubación a 22°C, las germínulas obtenidas (cuya longitud debe ser al menos 7 veces la de la espora original) se recogieron por filtración y se lavaron con abundante NaCl 0,7 M. A continuación se recogieron con una espátula estéril y se resuspendieron en 15 ml de una solución enzimática preparada en NaCl 0,7 M que contiene 13 g/l de lysing enzymes (p/v) de *Trichoderma harzianum* (Sigma), 33 g/l de Driselasa de Basidiomicetos (Sigma) y 60 mg/l de quitinasa de *Streptomyces griseus* (Sigma). La solución enzimática se mezcló en agitación durante 30 minutos, se centrifugó durante 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C y se pasó por un filtro de 0,45 µm (MILLEX® Filer Unit, MF-Millipore, MCE Membrane). El tratamiento enzimático se prolongó entre 30 minutos y 1 hora en agitación a 100 rpm hasta la formación de protoplastos. Una vez obtenidos los protoplastos, se pasaron por un filtro de borosilicato de tamaño de poro 0 (GlasFilter, ROBU), se recogió el filtrado en una caja de Petri y se volvió a pasar por otro filtro de borosilicato, en este caso de tamaño de poro 1. Todo el filtrado se pasó a un tubo *Falcon* de 50 ml, se llevó hasta un volumen

de 50 ml con NaCl 0.7 M, y se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 minutos a 3.000 rpm. Después se eliminó el sobrenadante y se volvió a resuspender el precipitado de protoplastos en 50 ml de NaCl 0.7 M. Se repitió la centrifugación y los protoplastos se resuspendieron en STC 1x (Sorbitol 1,2 M, Tris-HCl 20 mM pH 8, CaCl₂ 50 mM). Se centrifugó de nuevo y ahora el precipitado se resuspendió en los μ l de STC 1x necesarios para obtener una concentración de $3 \cdot 10^8$ protoplastos/ml. Finalmente se alicuotaron en 100 μ l para su uso directo o para su congelación en 10% PEG 6000 y 1% DMSO (v/v).

Transformación de protoplastos

Para la transformación de protoplastos se añadieron los siguientes componentes en el siguiente orden: 50 μ l de STC 2x, el volumen necesario para añadir 10 μ g de ADN y se completó hasta 100 μ l con H₂O. Esta mezcla se añadió a 100 μ l de protoplastos ($3 \cdot 10^8$ protoplastos/ml) y se homogeneizó suavemente por inversión. Posteriormente se le añadió a la mezcla 50 μ l de PEG 8000 al 30%, se homogeneizó de nuevo por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Durante la incubación se preparó medio de regeneración de cobertera y se mantuvo a 50°C. La mezcla de transformación pasó a un tubo de 10 ml al cual se le añadieron 2 ml de PEG 8000 al 30%, se mezcló suavemente invirtiendo el tubo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron 4 ml de STC 1x, se mezcló de nuevo cuidadosamente y se centrifugó 15 minutos a 3.000 rpm. A continuación se eliminó el sobrenadante dejando alrededor de 200 μ l de la mezcla, de forma que se pueda resuspender bien el precipitado. A lo largo de los distintos pasos, se evitó hacer burbujas en la manipulación de los protoplastos. Luego se añadieron 50-100 μ l de la suspensión de protoplastos a 7 ml de agar de cobertera, se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo y se extendió en una caja de Petri con medio de regeneración. Tras 12-14 horas de incubación se añadieron otros 7 ml de agar de cobertera con higromicina B (1 mg/ml concentración final) a cada caja de Petri inoculada previamente con protoplastos.

Para los controles de regeneración y selección, se realizó el mismo proceso de transformación con 50-100 μ l de la suspensión de protoplastos pero sin añadir ADN. Para el caso del control de regeneración el agar de cobertera careció del antibiótico.

Inactivación dirigida de genes

La delección de genes de *F. oxysporum* se llevó a cabo mediante reemplazamiento génico dirigido utilizando la técnica de inactivación de genes de *Neurospora* (Rose et al., 1990; Colot et al., 2006). Esta técnica se basa en el reemplazamiento del gen diana por un cassette de resistencia a un antibiótico mediante la recombinación homóloga entre secuencias circundantes de dicho gen

diana, y las mismas secuencias presentes también en el vector rodeando a dicho cassette (Figura M1).

Para la construcción del vector se utilizó el mecanismo de recombinación homóloga de *S. cerevisiae*. Por una parte se obtuvo mediante amplificación por PCR la secuencia promotora del gen diana, que posee en el extremo más alejado del gen una cola de unos 20 nucleótidos, presente en el cebador que se utiliza en la PCR, que pertenece a la secuencia del vector que utilizamos en esta técnica, pRS426; el mismo producto de PCR posee en su extremo más próximo al gen otra cola de tamaño similar y con homología con un extremo del *cassette* de resistencia *hyg*^R (que contiene el gen *hph* bajo control de secuencias reguladoras de *Aspergillus nidulans*). Por otra parte, se obtuvo de la misma forma la secuencia terminadora del gen diana, que posee colas en sus extremos pero en este caso localizadas al contrario: en el extremo próximo al gen posee la cola con una secuencia del *cassette* de resistencia, y en el extremo opuesto la cola con una secuencia del plásmido pRS462. Se obtuvo también mediante PCR el *cassette* *hyg*^R, en cuyos extremos se encuentran las secuencias de las colas introducidas a cada uno de los fragmentos. Finalmente, se usó el plásmido pRS426 abierto por la secuencia de multiclonación mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, de forma que se evita la autoligación del plásmido abierto.

Una vez obtenidos todos los fragmentos, se introducen por transformación en la estirpe adecuada de *S. cerevisiae*, donde recombinarán los distintos fragmentos por las secuencias coincidentes de sus extremos. De esta forma se generó un plásmido cerrado derivado de pRS426 que contiene el *cassette* de resistencia rodeado por las secuencias promotora y terminadora del gen diana. Este vector se utilizó posteriormente para transformar *F. oxysporum* y conseguir los mutantes deseados .

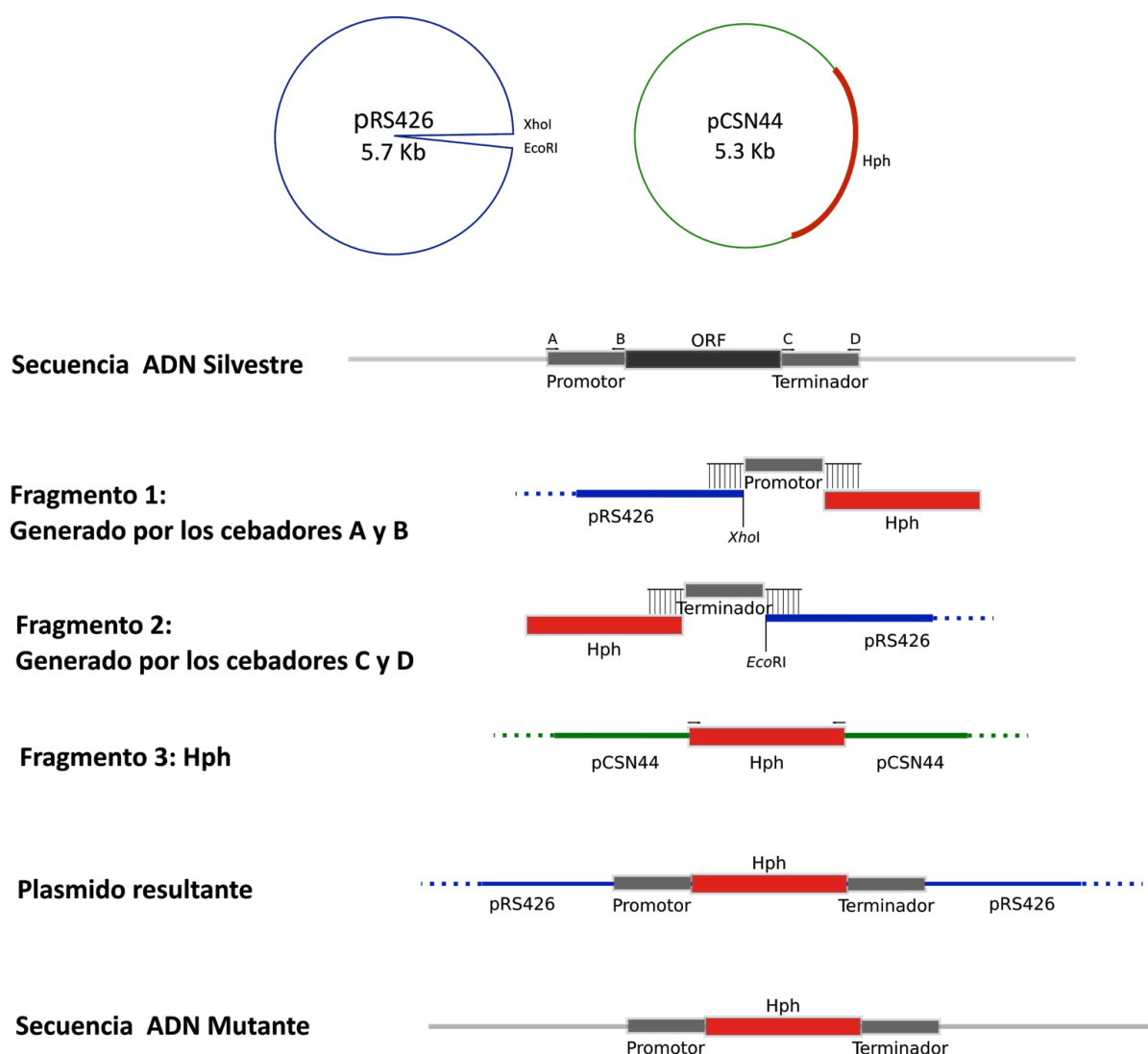


Figura M1. Construcción de cassettes de delección mediante recombinación homóloga realizada en *Saccharomyces cerevisiae*.

Extracción y análisis de carotenoides

Para la extracción de carotenoides se utilizaron muestras de micelio crecidas en cajas de Petri con medio DGasn sólido, utilizando 2 cajas por ensayo/muestra. Por el método de siembra, cada caja contiene 7 colonias. Tras una semana de incubación bajo condiciones de oscuridad o de luz, las colonias se separaron cuidadosamente del agar con la ayuda de un bisturí, y las muestras de micelio se congelaron, se liofilizaron y se pesaron. Las cantidades de micelio liofilizado que se usaron para la extracción de carotenoides oscilaron entre 50 mg para la estirpe silvestre y 25 mg para las estirpes superproductoras de carotenoides. Las extracciones de carotenoides se hicieron en

tubos *ependorf* de 2 ml con tapón de rosca, empleando un homogeneizador de células FastPrep 24 Instrument (MP Biomedicals). A cada muestra de micelio liofilizado (25-50 mg) se le añadieron unos 200 μ l de arena de playa y 1 ml de acetona, y los tubos se sometieron a 2 pulsos de 30 segundos a 6.5 m/s en el homogeneizador con un descanso de 5 minutos por cada pulso. Tras cada paso de dos pulsos, las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm y se pasó el sobrenadante de acetona a un tubo limpio, en el que se fueron acumulando los carotenoides extraídos. El procedimiento se repitió hasta que el micelio quedó completamente incoloro. El número de ciclos de extracción varió con la estirpe en función de su contenido en carotenoides. Cuando terminó la extracción, la acetona recogida se centrifugó a 13.000 rpm para eliminar los restos de micelio y arena, se pasó a un tubo limpio y se dejó secar en una centrífuga de vacío (Speedvac de Eppendorf) a una temperatura inferior a 40°C. Los extractos se disolvieron en acetona y se determinaron los espectros de absorción desde 350 a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640, (Beckman Coulter, Froullerton, California, EEUU). La concentración de carotenoides se calculó a partir de los valores de máxima absorción de los espectros en la acetona, asumiendo un coeficiente medio de extinción molar Σ de 250. 1 mg·l⁻¹·cm⁻¹

Inmunoprecipitación de cromatina

Extracción de cromatina e inmunoprecipitación

Para los análisis de inmunoprecipitación de cromatina, se empleó el protocolo descrito por Boedi et al., 2012 con algunas variaciones. Esta técnica se ha empleado en esta Tesis para cuantificar marcas epigenéticas en los promotores de algunos genes de interés para el estudio de la regulación de la carotenogénesis.

Una vez realizado el cultivo, se añadió formaldehído a una concentración final del 0,5% durante 15 minutos en las mismas condiciones de incubación. A continuación se añadió glicina a una concentración final de 125 mM durante 5 minutos, tras lo cual los cultivos se filtraron y los micelios se congelaron a -80°C.

Para la sonicación, el micelio congelado se trituró en mortero y se transfirieron 100 mg de micelio triturado a un tubo *ependorf* de 1,5 ml. El micelio se homogeneizó con 1 ml de la Solución de Sonicación, que contiene HEPES-KOH 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato sódico 0.1%, trichostatina A 0,5 μ M y cóctel inhibidor de proteasas 1x (cOMplete, Roche). La sonicación se realizó en un baño de ultrasonidos (Bioruptor®200, DIAGENODE) con ciclos de 30 segundos “ON” y 30 segundos “OFF” durante 30 minutos a máxima potencia, manteniendo siempre las muestras frías. Tras la sonicación, cada muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo. Este tubo contenía la cromatina fragmentada.

Antes de seguir con el protocolo de inmunoprecipitación de cromatina se comprobó su grado de fragmentación. Se retiró una alícuota de 100 μ l de cromatina de cada una de las muestras, se añadió Proteinasa K (0,3 mg/ml) y ARNasa (0,3 mg/ml) a cada una de las muestras y se llevó a un volumen final de 350 μ l de Solución de Sonicación. Después la mezcla se incubó durante 12-14 horas a 65°C, se trató con 1 volumen de fenol-cloroformo (v/v), se precipitó con etanol 96° y acetato sódico 3 M y el precipitado de ADN se resuspendió en H₂O. Se cuantificó la cantidad de ADN, se corrió una alícuota en un gel al 1.2 % de agarosa, y se visualizó si la cromatina estaba suficientemente fragmentada. Se observó que la mayoría de las bandas fragmentadas se concentraban en la zona entre 250 y 700 pb. Sólo se continuó el protocolo de inmunoprecipitación con las distintas muestras si se reproducía este patrón de fragmentación.

Una vez comprobado el estado de la cromatina, las muestras se sometieron a una pre-limpieza con bolas magnéticas (Dynabeads Protein G, Invitrogen) para eliminar cualquier tipo de contaminación que pudiera adherirse a dichas bolas inespecíficamente. Se utilizaron 50 μ l de bolas por cada muestra, se sometieron a un tratamiento de limpieza con la Solución de Sonicación antes de estar en contacto con las muestras y se resuspendieron en un volumen final de 30 μ l por cada muestra. Una vez limpias, se añadieron 30 μ l de bolas a cada muestra de cromatina y se incubaron durante 1 hora a 4°C en una gradilla giratoria a 15 rpm. Con la ayuda de una gradilla magnética se separaron las bolas y se pasó la muestra de cromatina a un tubo limpio.

A continuación, se incubaron 200 ng de cromatina fragmentada con 2 μ g de anticuerpo procedentes de conejo (representados en la Tabla 3) en un volumen final de 1,2 ml de una Solución de Dilución, que contenía Tris-HCl 16,5 mM pH 8, NaCl 167 mM, EDTA 1,2 mM, Tritón X-100 1.1%, Trichostatin A 0,5 μ M y cóctel inhibidor de proteasas cOmplete 1x (Roche) a 4°C durante 12-14 horas en una gradilla giratoria a 15 rpm. Tras esta incubación se añadieron a la mezcla 30 μ l de bolas magnéticas previamente lavadas con Solución de Dilución, y se incubó durante 1 hora a 4°C en una gradilla giratoria a 15 rpm.

Para finalizar el proceso de incubación la muestra se sometió a una serie de lavados. La muestra se mantuvo durante todo el lavado en una gradilla magnética, de manera que en cada lavado se retira el sobrenadante y las bolas permanecen en el tubo, ya que estas tienen adherido el ADN que se ha unido al anticuerpo. Los lavados se hicieron con 4 soluciones diferentes en el orden que se indican, añadiendo en cada paso 1 ml de cada solución y manteniéndolo durante 5 minutos en gradilla giratoria a 15 rpm a temperatura ambiente:

1. Solución de lavado de baja concentración de sales: NaCl 150 mM, SDS 0,2%, Tritón X-100 0,5%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.
2. Solución de lavado alta concentración de sales: NaCl 500 mM, SDS 0,2%, Tritón X-100 0,5%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.

3. Solución de lavado de cloruro de litio: LiCl 0,25 mM, Na-deoxycolato 0,5%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, Ig Epal CA 630 0,5%.

4. Solución TE: EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.

Después de los lavados, se añadieron a las bolas 100 µl de una dilución 1/10 de una Solución de Resuspensión (SDS 1%, NaHCO₃ 0,1 M). Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 65°C. Tras esta incubación, se retiraron las bolas magnéticas con ayuda de la gradilla magnética y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio.

Para separar el ADN de las proteínas a las que se había adherido (*Reverse Crosslinking*), la muestra se trató con NaCl a una concentración final de 0,2 M y se incubó a 65°C durante 12-14 horas. Tras esta incubación, se añadió a la muestra una solución para una concentración final de EDTA 10 mM, Tris-HCl 40 mM pH 6,5 y Proteinasa K 0,2 mg/ml, y la mezcla se incubó durante 1 hora a 45°C. Después de esta incubación, se realizó un tratamiento con Fenol:Cloroformo (1:1 v/v), se lavó con 1 volumen de cloroformo y se precipitó con 2 volúmenes de etanol 96°, 10% acetato sódico 3 M y glucógeno. La muestra se resuspendió en 100 µl de H₂O desionizada y se guardó a -80°C hasta su uso para una PCR cuantitativa.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para ChIP.

Anticuerpo	Concentración	Nº Catálogo	Casa comercial
Histona H3K9ac (pAb)	1 µg/µl	39917-18	ACTIVE MOTIF
Histona H3K4me3 (pAb)	1 µg/µl	39915-16	ACTIVE MOTIF
Histona H3K9me3 (pAb)	Serum	39161-2	ACTIVE MOTIF
Histona H3 antibody	0,5 µg/µl	06755	Millipore
IgG	Serum	I8140	SIGMA

pAb: anticuerpo policlonal

Determinación de los niveles de las marcas epigenéticas

Se realizaron medidas por PCR cuantitativa utilizando como molde ADN inmunoprecipitado con un anticuerpo específico; es decir, se determinaron los niveles de cromatina inmunoprecipitada para cada gen bajo estudio mediante qPCRS. Para cuantificar el producto de reacción se utilizó el kit comercial *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technology) siguiendo las instrucciones del fabricante, junto con la muestra de ADN (10 ng) y la pareja de cebadores correspondiente a la secuencia de ADN objeto de estudio. La reacción de amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos con el equipo ABI 7500 (Applied Biosystems). El programa usado para la amplificación del ADN consistió en una pre-incubación de 5 minutos a 95°C, y 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 10 segundos a 72°C. Los cebadores utilizados en los análisis se describen en la Tabla 2. Una vez terminada la reacción se llevó a cabo un paso de disociación para analizar la curva y constatar la amplificación de un solo producto. Para cada muestra se realizaron tres réplicas técnicas en la placa

para comprobar la reproducibilidad. Para que la eficiencia de la amplificación sea del 100%, la pendiente de la curva del análisis de unas muestras de concentración seriada debe tener un valor (m) aproximado a 3,3, estableciendo así un factor de amplificación óptimo de 2.

Con el fin de verificar que la pareja de cebadores utilizados en cada región analizada es apta para el análisis, se prepararon diluciones seriadas de cromatina de una de las muestras y se llevó a cabo la reacción de amplificación. Se utilizó un programa *on-line* de cálculos de eficiencia de qPCR, que determina el factor de amplificación de la pareja de cebadores a partir de la pendiente de la recta resultante en la amplificación de la dilución seriada realizada ([http:// dharmacon.horizondiscovery.com/resources/tools-and-calculators/qpcr-efficiency-calculator/](http://dharmacon.horizondiscovery.com/resources/tools-and-calculators/qpcr-efficiency-calculator/)). Si el factor de amplificación está en torno a 2, la pareja de cebadores es apta para el análisis.

Bioinformática

Análisis y tratamiento de secuencias

Las secuencias de ADN y las informaciones del genoma de *F. oxysporum* se obtuvieron a través del servidor del Broad Institute (www.broadinstitute.org) y a través del servidor EnsemblFungi (<http://fungi.ensembl.org>). Esta última fuente también se utilizó para obtener la identidad y localización de dominios para el diseño de los cebadores de interés.

Los análisis BLAST y BLASTP se realizaron a través del servidor del NCBI (National Center of Biotechnology and Informatics. www.ncbi.nlm.nih.gov).

Las secuenciaciones se realizaron a través de la empresa Stab Vida, y se analizaron con el programa informático de alineamiento de secuencias ClustalW2 (European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory, EMBL-EBI) y a través del software Nucleobytes 4Peaks (2004-2015 Nucleobytes B.V).

Los mapas de restricción, las fases abiertas de lectura y las secuencias complementarias de las secuencias de ADN se analizaron con los programas Serial Cloner 2.6.1 (Serial Basic 2004-2013) y SnapGene 2.6.2 (SnapGene® 2004-2018).

Tratamiento de los datos de RNA-Seq

La secuenciación para el análisis de RNA-Seq la llevó a cabo la empresa LifeSequencing (Valencia) mediante la plataforma Illumina. Esta empresa determinó también los análisis de calidad de las muestras a través del parámetro RIN. Las características de las muestras de ARN utilizadas por la empresa se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Datos de las muestras de ARN utilizadas en el análisis de RNA-Seq.

Muestra/Condición	Referencia	260/280	RIN	Concentración (ng/μl)	Ng Totales
Silvestre oscuridad R1	150022	2,1	9.80	177	8850
Silvestre luz R1	150023	2,09	10	187	9350
T2 oscuridad R1	150024	2,09	9.90	308	15400
T3 oscuridad R1	150025	2,09	10	194	9700
SX1 oscuridad R1	150026	2,09	10	222	11100
SX2 oscuridad R1	150027	2,09	10	178	8900
Silvestre oscuridad R2	150028	2,1	9.80	200	10000
Silvestre luz R2	150029	2,04	9.70	223	11150
T2 oscuridad R2	150030	2,08	10	208	10400
T3 oscuridad R2	150031	2,1	10	207	10350
SX1 oscuridad R2	150032	2,05	10	161	8050
SX2 oscuridad R2	150033	2,09	10	175	8750

Para el análisis estadístico y gráfico de los datos de secuencias se usó el programa Rstudio 3.1, basado en *scripts* proporcionados por el Dr. Francisco Romero-Campero (Departamento de ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial, Universidad de Sevilla) y el programa para análisis de datos Bioconductor (www.bioconductor.org). Para el mapeo y visualización de lecturas genómicas de las muestras analizadas se usó la aplicación IGV (Integrative genomics viewer 2.3.57).

El proceso de las muestras del protocolo de Illumina se resume en los siguientes pasos:

- Enriquecimiento del ARN mediante poli-A. Teniendo en cuenta que una gran mayoría de ARN presente en las células es ribosómico, el enriquecimiento asegura que se obtiene una cantidad de ARN adecuada para el análisis de interés.
- Fragmentación de ARN. Tras la purificación del ARN, éste se fragmenta a tamaños de 100 a 300 pares de bases.
- Síntesis de ADNc de doble cadena. Se lleva a cabo una transcripción inversa de las moléculas de ARN anteriores con oligo dT.
- Uso de adaptadores para los extremos terminales.
- Selección de fragmentos de tamaño similar y posterior amplificación por PCR.

El tratamiento de los datos de la secuenciación por la plataforma Illumina se realizó a través de la plataforma CICA (Centro Informático Científico de Andalucía) utilizando el protocolo Tuxedo, con el asesoramiento y colaboración del Dr. Francisco Romero-Campero. Para el control de calidad se usó el paquete de software FastQC.

El mapeo de lecturas frente al genoma de referencia de *F. oxysporum*, el ensamblaje de los transcritos y el estudio de la expresión diferencial se analizaron utilizando las herramientas Bowtie, TopHat, Cufflinks y Cuffmerge (Trapnell et al., 2012), utilizando parámetros que los programas asignan por defecto. En concreto, se utilizó Tophat para mapear las lecturas frente al genoma de referencia y Cufflinks para el ensamblaje de los transcritos. Los resultados obtenidos se integraron con la herramienta Cuffmerge. Los niveles de expresión génica se obtuvieron en FPKM (fragmentos por kilobase de transcritos por cada millón de mapeos) con la herramienta Cuffdiff, la cual aplica una normalización en las lecturas obtenida en la secuenciación eliminando los sesgos debido a la diferencia de longitud de los transcritos (Garber et al., 2011), determinando así la expresión diferencial. El resto del análisis y la visualización de los resultados se realizó a través del paquete CummeRbund, obtenido de la plataforma Bioconductor (www.bioconductor.org), que maneja este tipo de archivos a través de *scripts* en lenguaje R. La cadena completa de procedimientos (*Pipeline*) se resumen en la Figura M2.

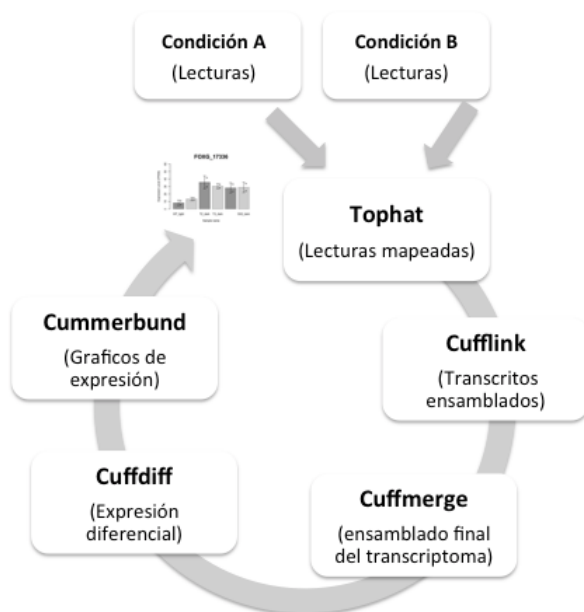


Figura M2. Secuencia de los procedimientos en el tratamiento y obtención de datos de RNA-Seq desde el sistema de secuenciación de Illumina. Modificado de Trapnell et al., 2012.

La generación de categorías GO se basó en la anotación automática del genoma de *F. oxysporum* usando los dominios proteicos detectados por la base de datos de Pfam. La falta de asignación de los genes de *F. oxysporum* dificultó la asignación de dominios. Para la identificación de las asignaciones GO se usó la aplicación REVIGO (<http://revigo.irb.hr>). En este servidor *web* se simplifican las listas de los términos GO mediante la búsqueda de un subconjunto representativo de los términos, usando un algoritmo de agrupamiento simple que se basa en medidas de similitud (Supek et al, 2011).

Resultados

Capítulo 1

RESULTADOS

Capítulo I. ANÁLISIS FUNCIONAL DE DOS POSIBLES GENES PARA PRECURSORES DE microARN

Introducción

Los hongos del género *Fusarium* destacan por la complejidad de su metabolismo secundario. Muchos de los metabolitos producidos son micotoxinas que se encuentran en los alimentos derivados de las plantas contaminadas y pueden tener consecuencias dañinas en las personas y animales que los consumen (Desjardins, 2006; Desjardins y Proctor, 2007). Algunas especies de *Fusarium* han sido adoptadas como modelos de investigación de fitopatogénesis, por ejemplo *F. oxysporum* (Pietro et al., 2003; Michielse y Rep, 2009), o de producción de metabolitos secundarios, como *F. graminearum*, *F. verticilloides* y *F. fujikuroi* (Desjardins y Proctor 2007; Gaffoor et al., 2005; Avalos et al., 2007). Algunos de dichos metabolitos tienen aplicaciones biotecnológicas, o incluso pueden ser deseables para el consumo humano. Ejemplos representativos son los terpenoides, tales como las giberelinas, hormonas promotoras del crecimiento vegetal con aplicaciones en la agricultura y en la industria cervecera (Rademacher, 1997) y los carotenoides, pigmentos liposolubles con propiedades antioxidantes y efectos beneficiosos para la salud (Namitha y Negi, 2010). Los carotenoides son producidos por todos los organismos fototróficos, donde funcionan como pigmentos accesorios de la maquinaria fotosintética (Telfer, 2005), y por muchas bacterias heterotróficas y hongos (Britton et al., 1998). Entre estos últimos se incluye el género *Fusarium*, el cual produce un apocarotenoide carboxílico, la neurosporaxantina (NX), cuya ruta biosintética ha sido ya descrita en detalle en la introducción general. En ella desempeñan un papel central las enzimas codificadas por los genes *carRA* y *carB*, necesarios para la síntesis tanto de la NX como del retinal, y que se usan en este y otros capítulos como genes representativos de los genes estructurales de la carotenogénesis.

Como se ha mencionado también anteriormente, la regulación de la síntesis de los carotenoides se ha estudiado muy especialmente en *F. fujikuroi*, donde se ha prestado especial atención a la inducción por la luz (Avalos y Estrada, 2010). Una pista especialmente valiosa para entender los mecanismos de regulación la proporciona la existencia de mutantes afectados en tales mecanismos. En *Fusarium* se conocen mutantes superproductores de carotenoides, de fuerte pigmentación anaranjada y genéricamente llamados mutantes *carS*, cuyas características han sido ya descritas. El gen responsable del fenotipo *carS* se identificó por primera vez en *F. oxysporum* gracias al escrutinio de una extensa colección de mutantes insercionales de ADN-T mediados por *Agrobacterium tumefaciens*. En el escrutinio se identificaron tres

transformantes superproductores de carotenoides: 20B12 (abreviado como T1), 93C9 (T2) y 107E6 (T3).

El estudio detallado del ADN circundante en el lugar de inserción del ADN-T mostró que dos de los transformantes, T2 y T3, poseían la inserción en una región próxima al gen *Foxg_09307*. Este gen se identificó posteriormente como el gen *carS* gracias a la presencia de mutaciones relevantes en su secuencia codificante en mutantes obtenidos por mutagénesis química. Así, el mutante SX1 posee una mutación puntual en dicha región codificante consistente en una transición de G₁₁₀₉ a A, que se espera que provoque un cambio de aminoácido de Gly₃₇₀ a Asp. Por su parte, el mutante SX2 posee dos transversiones, una de las cuales provoca un codón de STOP prematuro, que se espera que dé lugar a un polipéptido truncado. Como prueba adicional, aunque el transformante T1 no poseía ninguna inserción de ADN-T en el entorno del gen *carS*, la secuenciación de este gen demostró la presencia de una inserción de 5 pb, correspondiente a la secuencia ACATA. En esta estirpe, el codón silvestre TAT, correspondiente al aminoácido Tyr₁₀₈, es reemplazado por la secuencia TAacataT (en minúsculas se indica la inserción), dando lugar a un codón de STOP en fase, TAA. Por tanto, con independencia del cambio de fase en la lectura, se espera que el transformante T1 produzca un polipéptido truncado (Rodríguez-Ortiz, 2012). Mutaciones similares se encontraron en los mutantes *carS* de *F. fujikuroi* en su gen ortólogo (Rodríguez-Ortiz et al, 2013).

Como pruebas genéticas definitivas de la identidad del gen *carS*, el fenotipo superproductor de carotenoides fue reproducido por una delección parcial del gen *Foxg_09307* en *F. oxysporum*, y la copia homóloga de este gen de *F. fujikuroi* (*Ffuj_08714*, 93% de identidad a nivel de ADN con *Foxg_09307*), fue capaz de complementar un mutante de fenotipo *carS* tanto en *F. fujikuroi* como en *F. oxysporum* (Rodríguez-Ortiz et al., 2012; 2013). En apoyo de todas estas observaciones, el gen *carS* muestra similitud de secuencia y organización proteica con la proteína codificada por el gen *crgA* de *Mucor circinelloides*, cuya mutación da igualmente un fenotipo superproductor de β-caroteno en esta especie.

La causa del fenotipo superproductor de carotenoides en los transformantes T2 y T3 aún está por determinar. La ausencia de mutación en sus alelos *carS* sugiere que su fenotipo se debe a un efecto regulador en la zona de inserción del ADN-T. Ambos mutantes coinciden en la presencia de alteraciones en la región intergénica entre los genes *Foxg_09306* y *carS* (*Foxg_09307*) (Figura C1.1), una región de aproximadamente 4.5 kb carente de marcos abiertos de lectura. Además, T3 posee una integración de ADN-T entre *Foxg_09304* y *Foxg_09305*. La ausencia de genes en la región intergénica entre los genes *carS* y *Foxg_09306* se basa en la anotación publicada en el servidor del genoma de *F. oxysporum*, y en la ausencia de similitudes con ningún gen conocido

cuando se realizan análisis BLAST. En un estudio anterior (Rodríguez-Ortiz, 2012) se analizó dicha secuencia con un programa de predicción de estructuras secundarias características de microARN y se encontraron dos secuencias potenciales de genes precursores de microARN. El primero de ellos se ubica a -3.830 pb del codón de inicio del gen *carS* y a +282 pb del límite estimado para la alteración genómica encontrada en T2, y abarca una secuencia de 276 pb (Figura C1.2 A).

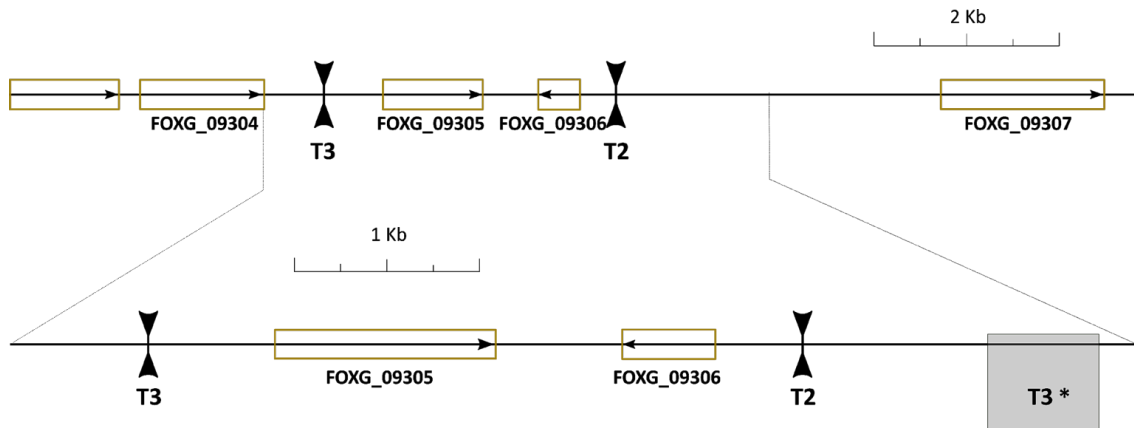


Figura C1.1. Mapa de la región genómica estudiada entre los genes *Foxg_09304* y *Foxg_09307*. Los sitios aproximados de inserción se indican con triángulos negros y una segunda región afectada se representa como una caja gris (T3*). Modificado de Rodríguez-Ortiz, 2012.

De acuerdo con la predicción informática, el gen precursor de este supuesto microARN se expresaría en dirección contraria a *carS*, y su homólogo conocido más parecido es el microARN humano *hsa-mir-108*. El segundo presunto microARN se encuentra más próximo al gen *carS* a -1.802 pb, abarca una secuencia de 420 pb y su homólogo conocido más parecido es el microARN humano *hsa-mir-135b* (Figura C1.2 A).

Los miARN son pequeños ARN interferentes de unos 20-25 nucleótidos, que se generan a partir de precursores específicos no codificantes que, al transcribirse a partir de secuencias genómicas se pliegan en horquillas moleculares que contienen segmentos de complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en dos etapas catalizadas por dos tipos de enzimas, Drosha en el núcleo y Dicer en el citoplasma. Los miARNs pueden inhibir la traducción de ARNm o bien inducir su degradación, iniciándose con la eliminación de la cola poliadenilada del ARNm (Pillai, 2005; Bartel, 2004). La interferencia de ARN es un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional/transcripcional dependiente de homología en eucariotas. El hongo filamentoso *N. crassa* fue uno de los primeros organismos usados para el estudio de ARN interferentes (ARNi). El silenciamiento génico y meiótico causado por el ADN no apareado son dos fenómenos relacionados con el ARNi en *Neurospora* y su caracterización ha contribuido significativamente a entender el mecanismo de acción de los ARNi en eucariotas (revisado por Li et al., 2010). Existen al

menos 6 rutas diferentes responsables de estas pequeñas moléculas de ARN, estableciendo *Neurospora* como un modelo de estudio en la función y biogénesis de pequeños ARNs. Datos posteriores en *Cryptonectria*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis*, y otras especies, indican que el ADN_i está ampliamente conservado en los hongos filamentosos y juega un papel importante de defensa en el genoma (Li et al., 2010). Estos ARNs no codificantes participan en una amplia y diversa colección de eventos regulatorios que abarcan desde controlar el número de copias en bacterias (del Solar y Espinosa, 2000) a la inactivación del cromosoma X en mamíferos (Mlynarczyk y Panning, 2000). La mayoría de los miARN estudiados, regulan negativamente la expresión de sus genes diana a nivel postranscripcional (Bartel, 2004; Lai, 2003).

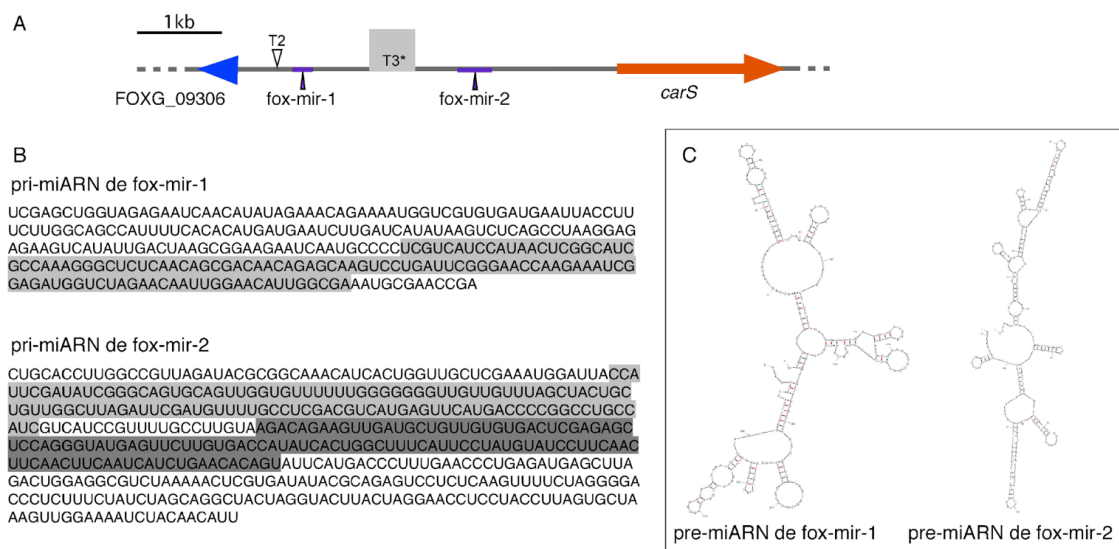


Figura C1.2. A Ubicación de los genes para los supuestos precursores de microARN *fox-mir1* y *fox-mir2* en la secuencia intergénica entre *Foxg_09306* y *carS*. Se representa también el sitio de integración del ADN-T en el mutante T2 y la región alterada en el mutante T3 (cuadrado gris). **B** Secuencia de ARN de los posibles precursores de microARN *fox-mir1* y *fox-mir2*. Se indican en gris las secuencias con mayor probabilidad de producir microARN maduros. **C** Estructura de los pre-microARNs de *fox-mir1* y *fox-mir2* de acuerdo con las configuraciones de más baja energía ($\Delta G = -63,3$ y $\Delta G = -80,1$, respectivamente) según el programa mfold (Rodríguez-Ortiz, 2012).

Teniendo en cuenta resultados previos en la bibliografía, la posible presencia de dos precursores de microARN en la región genómica de *carS* y su posible papel como reguladores negativos del ARNm de *carS*, podría ser uno de los mecanismos de regulación de la carotenogénesis. Las secuencias de los posibles precursores de miARNs encontrados en la región genómica anterior al gen *carS* se denominaron *fox-mir-1* y *fox-mir-2* (Figura C1.2 B y C) (Rodríguez-Ortiz, 2012), y su posible función en *F. oxysporum* es objeto de estudio en este capítulo.

Resultados

Producción de carotenoides en las estirpes superproductoras

A fin de iniciar el estudio del posible papel regulador de los presuntos microARN de *F. oxysporum*, como primer paso se volvió a comprobar el fenotipo de los dos transformantes superproductores de carotenoides con alteraciones en la región del gen *carS*, así como el de dos mutantes del gen *carS* anteriormente estudiados, SX1 y SX2. El transformante T1 no se incluyó en el estudio por poseer una inserción de cinco bases en la propia secuencia del gen *carS*, ya que aportaría la misma información que SX1 y SX2. Como se esperaba, las cuatro estirpes contienen más carotenoides que la estirpe silvestre, aunque T3 muestra un fenotipo menos acusado, especialmente en la oscuridad (Figura C1.3). Estos resultados son coherentes con un estudio anterior de las mismas estirpes (Rodríguez-Ortiz, 2012).

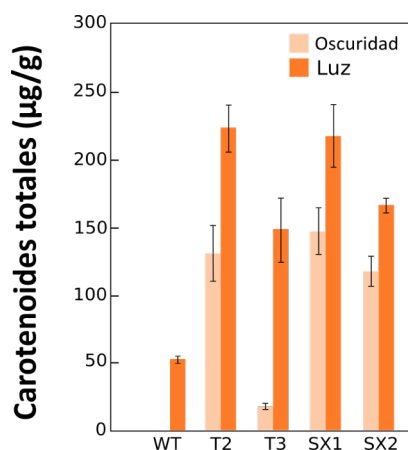


Figura C1.3. Contenido en carotenoides de varios mutantes superproductores. T2 y T3 son transformantes insercionales, SX1 y SX2 se obtuvieron por mutagénesis química. Los carotenoides se extrajeron de colonias incubadas sobre agar DGasn durante 7 días en oscuridad o en la luz. Los datos son la media de 3 réplicas biológicas independientes y las barras representan el error de la media.

Transcripción de los presuntos genes de precursores de microARN *fox-mir-1* y *fox-mir2*

Las secuencias de *fox-mir1* y *fox-mir2* permanecen íntegras en los transformantes T2 y T3. Sin embargo, estos mutantes tienen alteraciones en secuencias de ADN próximas, que podrían afectar la transcripción de los presuntos precursores de estos microARNs. Con el propósito de estudiar la posible relación del fenotipo de sobreproducción de carotenoides con la transcripción de *fox-mir-1* y *fox-mir2*, se estudiaron mediante RT-qPCR los niveles de los presumibles ARN precursores en las distintas estirpes superproductoras de carotenoides (Figura C1.4). En este mismo análisis se incluyeron también el gen regulador *carS* y, como controles de regulación de la ruta, los genes estructurales *carRA* y *carB*. Como se esperaba, las cantidades de ARNm de los genes *carRA* y *carB* fueron mucho más elevadas en todos

los mutantes superproductores de carotenoides tanto en la luz como en oscuridad. Llama la atención que los niveles fueron también muy altos en oscuridad en el transformante T3, aunque su contenido en carotenoides fuera relativamente bajo en comparación con las otras estirpes, indicando la existencia de mecanismos de regulación post-transcripcionales.

Como se esperaba, la cantidad de ARNm del gen *carS* muestra una inducción por la luz en la estirpe silvestre y en los propios mutantes *carS*, observándose también dicha inducción en los transformantes T2 y T3. Un resultado especialmente interesante es que los niveles de ARNm del gen *carS* fueron más reducidos en los transformantes T2 y T3 que en la estirpe silvestre, siendo la diferencia especialmente llamativa en el caso de T2. Sin embargo, los mutantes del propio gen *carS*, SX1 y SX2, mostraron niveles especialmente bajos en la oscuridad. No obstante, en todas las estirpes los niveles de ARNm de *carS* suben en la luz.

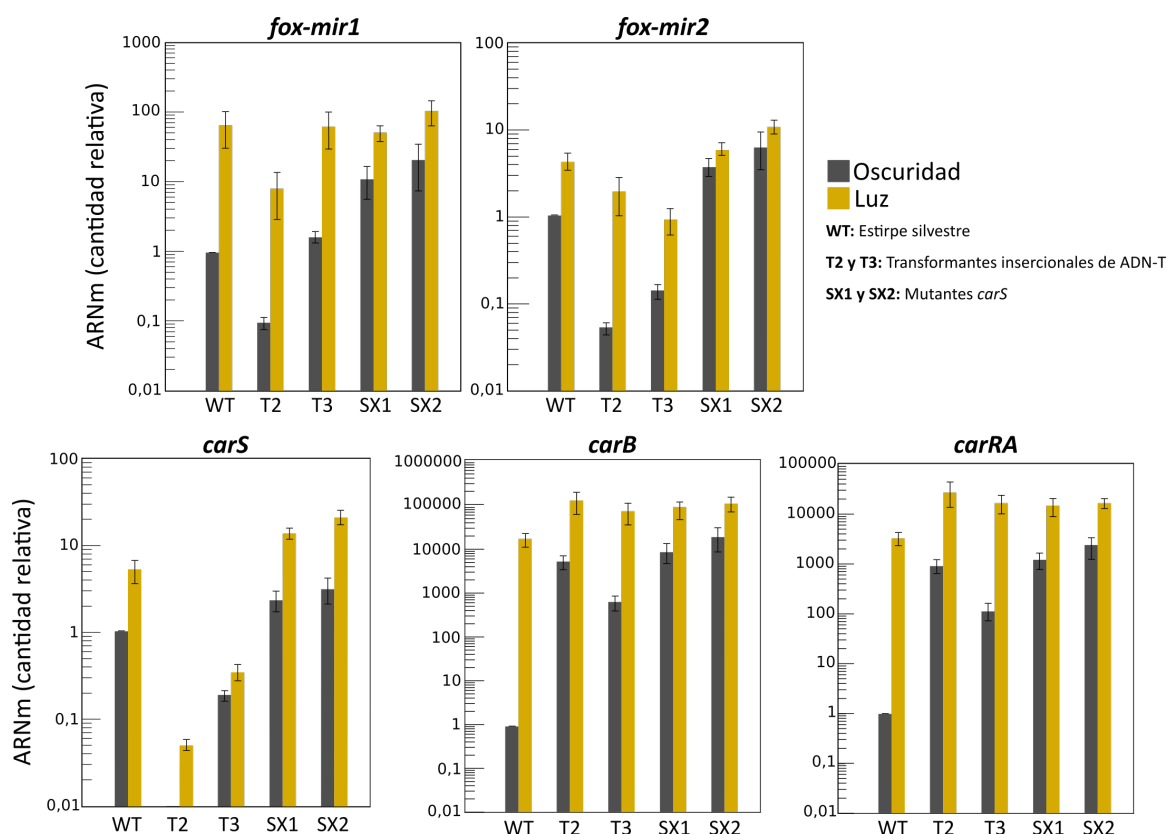


Figura C1.4. Niveles de los supuestos ARN precursores de *fox-mir1*, *fox-mir2*, así como de los ARNm de los genes *carS* y los genes estructurales *carB* y *carRA* en la estirpe silvestre y en las estirpes superproductoras de carotenoides. Las estirpes se cultivaron en medio DGasn líquido durante 3 días en oscuridad y en su caso se expusieron posteriormente 1 hora a la luz. Los resultados muestran la media y el error de la media de tres réplicas biológicas independientes.

Respecto a los niveles de los supuestos precursores de microARN en las mismas estirpes, se observaron patrones similares, pero no iguales para *fox-mir1* y *fox-mir2*. En

todos los casos sus cantidades fueron mayores en la luz que en la oscuridad, lo que indica también fotorregulación de estos transcritos. Con la única excepción de T3 para *fox-mir1*, en oscuridad las cantidades de los presuntos precursores de ambos microARN fueron mayores en los mutantes *carS* y menores en los transformantes, indicando motivos diferentes para el fenotipo desregulado de la carotenogénesis en ambos tipos de estirpe.

Interrupción dirigida de *fox-mir1* y *fox-mir2*

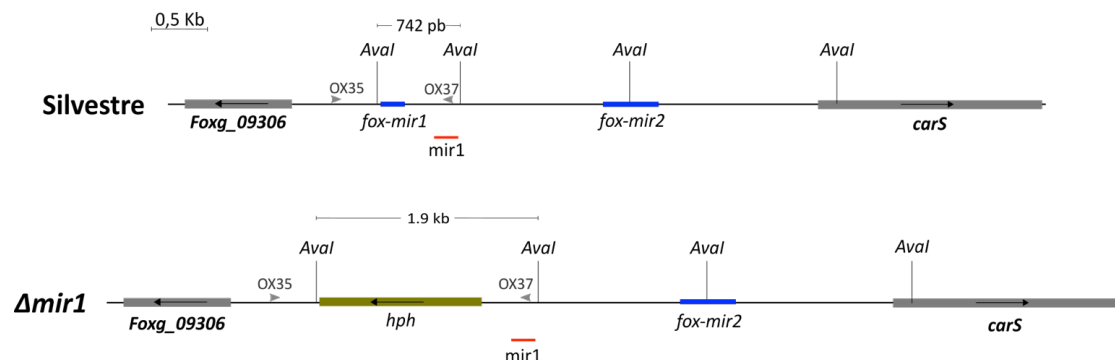
Los resultados descritos en el apartado anterior sugieren una posible implicación de los supuestos *fox-mir1* y *fox-mir2* en la regulación de la carotenogénesis en *F. oxysporum*. Para estudiar la posible función de *fox-mir1* y *fox-mir2* se generaron estirpes mutantes en fondo silvestre mediante reemplazamiento génico. Para construir los vectores se empleó la técnica de recombinación homóloga de levaduras (Colot et al., 2006), que permite sustituir el alelo silvestre por un marcador seleccionable, en este caso el *cassette* de resistencia a higromicina B Hyg^R. Para ello, se diseñaron cebadores que permitieron obtener mediante PCR, a partir de ADN genómico, fragmentos flanqueantes a la secuencia diana a sustituir de aproximadamente 1,5 kb. Dichos fragmentos correspondían a los extremos 5' y 3' del ADN diana y poseían unas colas específicas de homología al plásmido pRS426 y al *cassette* Hyg^R. Por otra parte, se obtuvo el *cassette* Hyg^R a partir de ADN del plásmido pCSN44 mediante PCR, y por último se utilizó el plásmido pRS426 abierto con las enzimas *XhoI* y *EcoRI*. Los tres fragmentos se introdujeron a la vez en levaduras competentes para generar por recombinación homóloga el plásmido con la construcción deseada (protocolo descrito en el apartado Material y Métodos).

Las construcciones con el *cassette* reemplazando las secuencias de los supuestos microARN se utilizaron para transformar protoplastos de la estirpe silvestre y obtener de esta forma transformantes resistentes a higromicina. El reemplazamiento correcto de las secuencias diana por el *cassette* hyg^R en los transformantes se verificó mediante PCR, usando combinaciones adecuadas de cebadores, y mediante hibridación por *Southern*. Los cebadores utilizados, así como la sonda correspondiente, se representan en las figuras C1.5A y C1.6A.

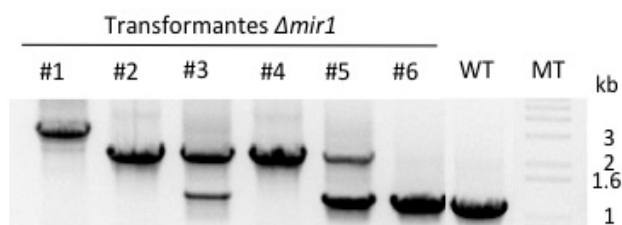
En el caso de la mutación $\Delta mir1$, se obtuvieron 6 transformantes, de los cuales solo dos mostraron una banda del tamaño esperado al amplificar por PCR con los cebadores Foxy-22F y Foxy-23F (OX35 y OX37 en la Figura C1.5A). La banda obtenida tras el reemplazamiento de *fox-mir1* por el *cassette* Hyg^R fue de 0,7 kb mientras que la banda del silvestre era de 1,2 kb (Figura C1.5B). Para la mutación $\Delta mir2$, se obtuvieron 8 transformantes, de los cuales cinco mostraron el patrón de bandas correspondiente a la sustitución de *fox-mir2* por Hyg^R al amplificar por PCR con los cebadores Foxy-6F y

PCR-mir2-07-1R, indicados respectivamente como OX10 y OMP826 en la Figura C1.6A. Los mutantes $\Delta mir2$ mostraron una banda de 2,7 kb frente a los 2 kb de la estirpe silvestre (Figura C1.6B).

A



B



C

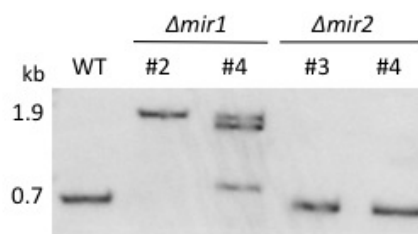


Figura C1.5. Delección dirigida de *fox-mir1* ($\Delta mir1$) en la estirpe silvestre. **A** Mapas de la región genómica donde se ubican los presuntos microARN en la estirpe silvestre y en el transformante con la sustitución de la región *fox-mir1* por un cassette de resistencia a higomicina (*hph*). Se muestran los cebadores externos que se usaron para amplificar la región completa, las sondas para la hibridación *Southern* y los sitios de corte para la endonucleasa *Aval*. **B** PCR de comprobación de la delección de *fox-mir1* en los transformantes. Se empleó ADN genómico de 6 transformantes y de la estirpe silvestre (WT) como control. Los cebadores utilizados fueron Foxy-22F (OX35) y Foxy-23R (OX37), que amplifican segmentos de 1,2 kb en la estirpe silvestre y 2,3 kb en los transformantes con el reemplazamiento esperado. Se incluye un carril con marcadores de tamaño (MT). **C** Hibridación *Southern* de las muestras de ADN genómico de los transformantes #2 y #4 (SX78 y SX79) digeridas con *Aval*. Se usó la sonda *mir1* indicada en rojo en el esquema superior. Los tamaños esperados son 0,7 kb para la estirpe silvestre (WT) y 1,8 kb para los transformantes $\Delta mir1$. Se añadieron como controles adicionales los transformantes $\Delta mir2$ #3 y #4 (SX80 y SX81).

Se eligieron dos transformantes positivos de $\Delta mir1$, ($\Delta mir1$ #2 y #4) y otros dos de $\Delta mir2$ ($\Delta mir2$ #3 y #4) para realizar una segunda verificación del reemplazamiento mediante *Southern*. Se obtuvieron muestras de ADN genómico de los transformantes, se digirieron con la enzima de restricción *Aval* y se separaron mediante electroforesis. Una vez comprobada visualmente la digestión completa de las muestras, se transfirieron a una membrana y se hibridaron con sondas correspondientes a regiones aledañas a los segmentos de ADN reemplazados, denominadas *mir1* y *mir2*, respectivamente (Figuras C1.5 y C1.6). La sonda *mir1* se obtuvo mediante PCR a partir de ADN del plásmido pDul8 amplificado con los cebadores Foxy-4F/Foxy-41R y la

sonda mir2 a partir de pDul7 con los cebadores Foxy-7F/Foxy-39R. Las sondas se eligieron de forma que cubrieran parte de la construcción pero no parte del segmento deletado, de manera que dieran lugar a patrones de bandas diferentes en la estirpe silvestre y en ambos tipos de mutantes.

Los resultados de la hibridación mostraron que los dos transformantes analizados para $\Delta mir1$ (#2 y #4) presentan una banda de 1,9 kb, correspondiente al reemplazamiento correcto de la secuencia diana por el *cassette* Hyg^R, frente a la banda de 0,7 kb de la estirpe silvestre. En el caso de #4, se observaron además otras dos bandas, consistentes con integraciones ectópicas de la construcción (Figura C1.5 C). En el caso de los transformantes analizados para $\Delta mir2$ (#3 y #4), ambos mostraron una banda de 4 kb, acorde con la sustitución de *fox-mir2* por el *cassette* Hyg^R, frente a la banda de 1,8 kb de la estirpe silvestre (Figura C1.6 C).

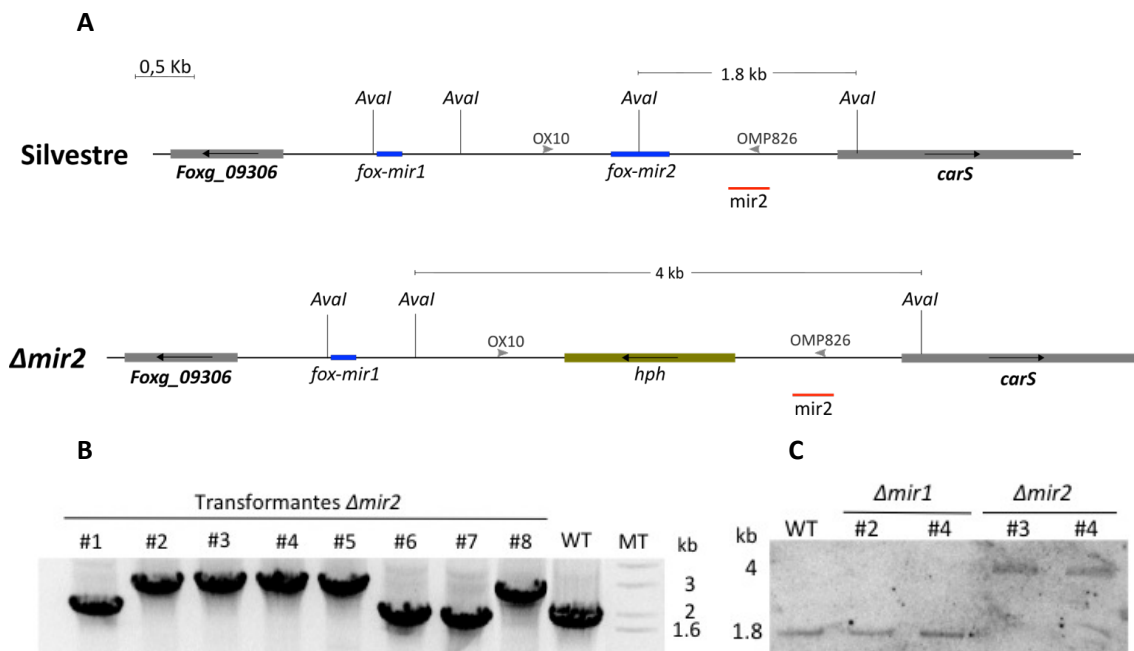


Figura C1.6. Delección dirigida de *fox-mir2* ($\Delta mir2$) en la estirpe silvestre. **A** Mapas de la región genómica donde se ubican los presuntos microARN, en la estirpe silvestre y en el transformante tras la sustitución de la región *fox-mir2* por un *cassette* de resistencia a higromicina (*hph*). Se muestran los cebadores externos usados para amplificar la región completa, las sondas para la hibridación *Southern* y los sitios de corte para la endonucleasa *Aval*. **B** PCR de comprobación de la delección de *fox-mir2* en los transformantes, usando ADN genómico de 6 transformantes y de la estirpe silvestre (WT) como control. Los cebadores utilizados fueron Foxy-6F (OX10) y PCR-mir2-07-1R (OMP826), que amplifican segmentos de 2 kb en la estirpe silvestre y 2,7 kb en los transformantes con el reemplazamiento esperado. Se incluye un carril con marcadores de tamaño (MT). **C** Hibridación *Southern* de las muestras de ADN genómico de los transformantes #3 y #4 (SX80 y SX81) digeridas con *Aval*. Se usó la sonda *mir2* indicada en rojo en el esquema superior. Los tamaños esperados son 1,8 kb para la estirpe silvestre (WT) y 4 kb para los transformantes $\Delta mir2$. Se añadieron como controles adicionales los transformantes $\Delta mir1$ #2 y #4 (SX78 y SX79).

Los dos transformantes obtenidos con la delección de *fox-mir1* se denominaron SX78 ($\Delta mir1$ #2), y SX79 ($\Delta mir1$ #4). Por su parte, los dos transformantes obtenidos con la delección de *fox-mir2* se denominaron SX80 ($\Delta mir2$ #3), y SX81 ($\Delta mir2$ #4). Estas cuatro estirpes se utilizaron para las caracterizaciones fenotípicas descritas en los siguientes apartados.

Caracterización de los transformantes $\Delta mir1$ ($\Delta fox-mir1$) y $\Delta mir2$ ($\Delta fox-mir2$)

- **Fenotipo de los transformantes $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$**

Para comprobar el efecto de las mutaciones $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$ sobre el fenotipo de *F. oxysporum*, se cultivaron la estirpe silvestre y los dos transformantes disponibles para cada mutación sobre medio mínimo DGasn durante siete días, en oscuridad o en iluminación. Tanto la morfología de las colonias como la velocidad de crecimiento fueron similares en las cinco estirpes en ambas condiciones de cultivo. Así, el seguimiento diario del diámetro de las colonias durante una semana no reveló diferencias apreciables entre ellas (Figura C1.7 A).

Como cabía esperar, las cinco estirpes presentaron en la oscuridad el mismo aspecto blanquecino. Sin embargo, mientras que la estirpe silvestre presentó su característica pigmentación anaranjada en la luz, los transformantes mostraron un fenotipo albino (Figura C1.7 B). Este resultado indica un defecto de los transformantes en la fotoinducción de la carotenogénesis, por lo que se procedió a analizar su contenido en carotenoides.

- **Síntesis de carotenoides en los transformantes $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$**

Se recogieron muestras de micelio de las cinco estirpes y se determinó el contenido en carotenoides en las condiciones de cultivo descritas en el apartado anterior. Los resultados mostraron una fuerte caída en la cantidad de carotenoides en los transformantes en la luz, especialmente en aquellos con la mutación $\Delta mir2$ (Figura C1.7C). Ante la duda de si el fenotipo albino en la luz se debía a ausencia de carotenoides o a un bloqueo de la desaturasa de fitoeno, el precursor incoloro de los carotenoides (ver Introducción general), se analizó el contenido en fitoeno de una de las muestras procedentes de los micelios iluminados de cada estirpe. Los datos mostraron una disminución en el contenido en fitoeno en los transformantes $\Delta mir1$ en relación con la estirpe silvestre, y su práctica total desaparición en los transformantes $\Delta mir2$ (Figura C1.7 D).

Los resultados indican que los mutantes $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$ están afectados en la capacidad de fotoinducir la síntesis de carotenoides, incluyendo la síntesis del precursor incoloro fitoeno, siendo dicha fotoinducción prácticamente inexistente en los mutantes $\Delta mir2$.

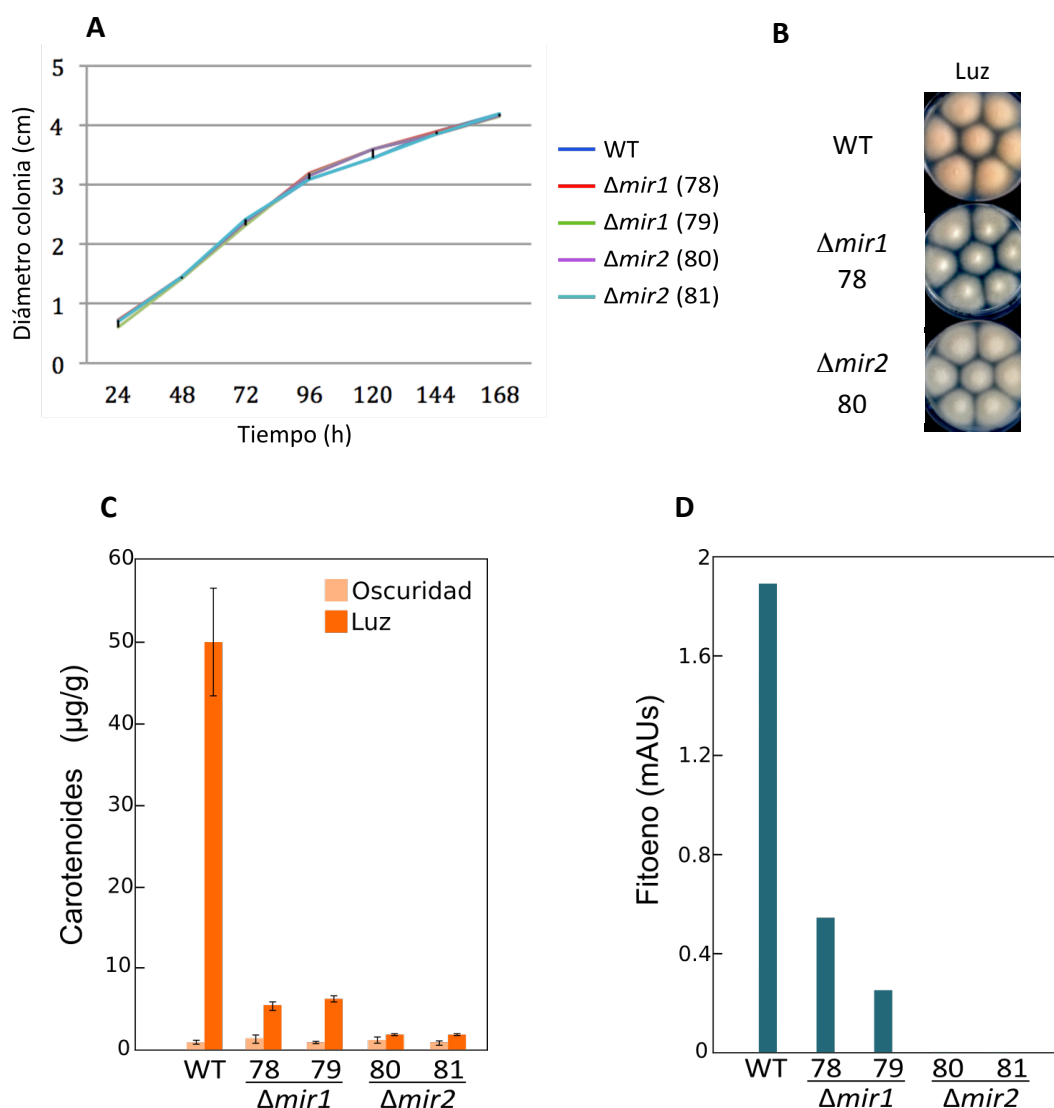


Figura C1.7. Caracterización fenotípica de los transformantes con las mutaciones $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$. Se analizaron la estirpe silvestre (WT) y los transformantes $\Delta mir1$ (SX78 y SX79) y $\Delta mir2$ (SX80 y SX81). Para simplificar, se indican en su caso los números de los mutantes SX. Las estirpes se incubaron 7 días en oscuridad o bajo la luz en medio mínimo DGasn. **A** Curva de crecimiento de colonias incubadas en la luz. **B** Aspecto de las colonias incubadas en la luz de la estirpe silvestre y de uno de los dos transformantes para cada mutación. **C** Contenido de carotenoides de las estirpes incubadas en oscuridad o en la luz. **D** Contenido en fitoeno de los cultivos incubados en la luz.

- **Expresión de los genes *car* en los mutantes $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$**

Como ya se ha indicado en la Introducción general, la fotoinducción de la síntesis de carotenoides tiene lugar principalmente a nivel de aumento de la

transcripción de los genes responsables. Para profundizar en la causa molecular del fenotipo albino de los transformantes en la luz, se determinaron los niveles de ARNm de los distintos genes *car* en respuesta a la luz en la estirpe silvestre y en los dos transformantes para cada mutación estudiados en el apartado anterior. Para ello, las estirpes se incubaron 3 días en oscuridad, se iluminaron en su caso durante una hora, y se determinaron mediante RT-qPCR las cantidades de ARNm de los cuatro genes del *cluster car* (*carRA*, *carB*, *carX* y *carO*) así como de los otros dos genes de la ruta biosintética de la neurosporaxantina (*carT* y *carD*), y del gen regulador *carS* (Figura C1.8).

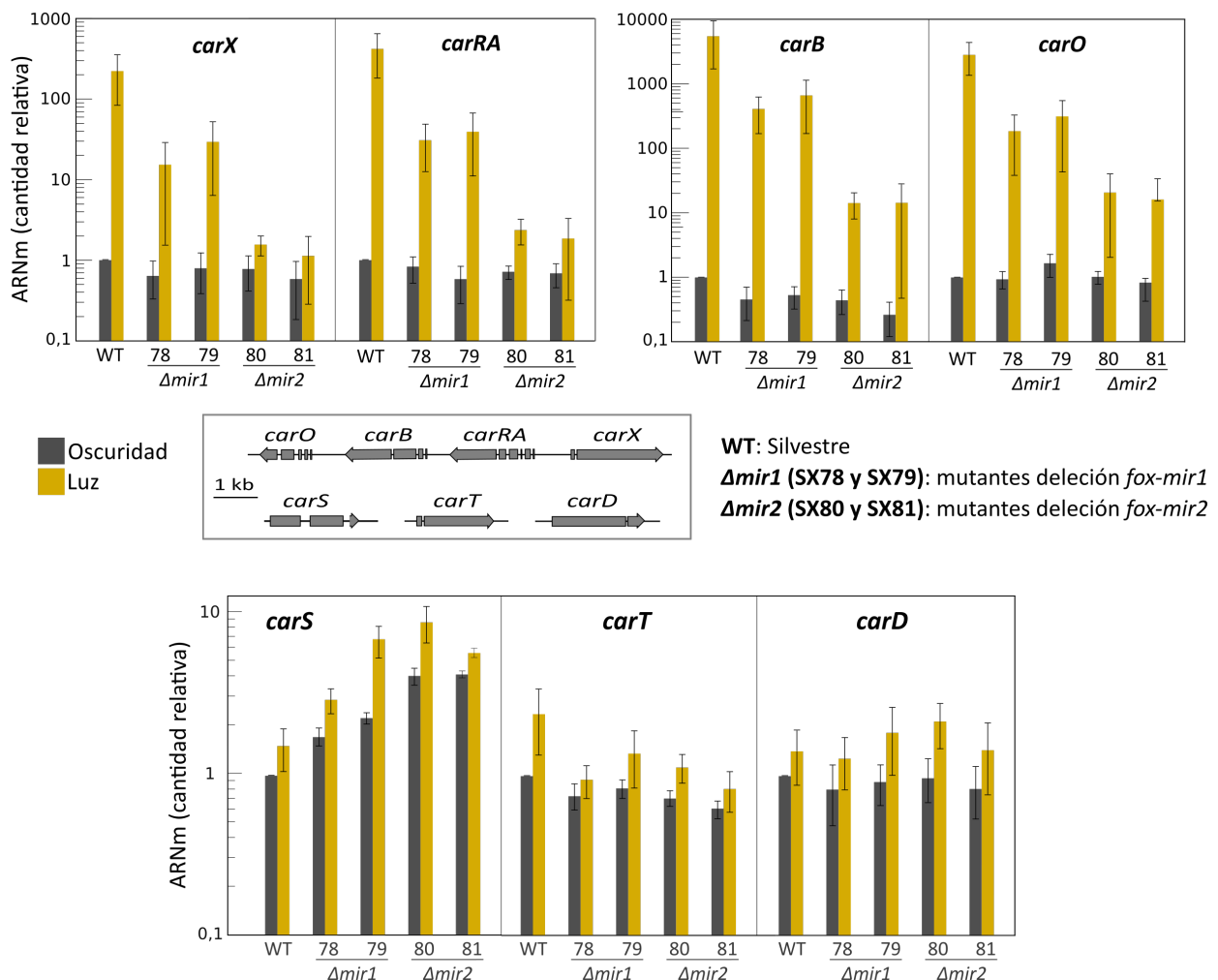


Figura C1.8. Efecto de la delección de *fox-mir1* y *fox-mir2* sobre los niveles de ARNm de los genes del *cluster car* (*carX*, *carRA*, *carB* y *carO*) y los genes *carT*, *carD* y *carS*. La estirpe silvestre (WT) y los transformantes $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$ se incubaron tres días en oscuridad y en su caso se expusieron una hora a luz. Para simplificar, se indican bajo los gráficos solo los números de los mutantes SX. En la parte superior se representan los niveles de ARNm de los genes del *cluster car* y en la parte inferior los de los genes *carS*, *carT* y *carD*. En la parte central se muestra la organización genómica de los genes analizados. Los resultados muestran la media y el error estándar de tres réplicas biológicas independientes.

En consonancia con los datos de carotenoides *in vivo* de la estirpe silvestre, se observó una disminución en la fotoinducción de los genes del *cluster car* de aproximadamente un orden de magnitud en los mutantes $\Delta mir1$ y dos órdenes de magnitud en los mutantes $\Delta mir2$, mientras que no se observaron cambios significativos en los dos últimos genes de la ruta, *carT* y *carD*. Sin embargo, en la oscuridad dichas mutaciones apenas tuvieron efecto sobre los niveles de ARNm de los genes indicados. Para la síntesis de carotenoides coloreados es imprescindible la participación de *carRA* y *carB*, por lo que la bajada en los niveles de ARNm de ambos genes en la luz es suficiente para explicar el fenotipo albino.

En todos los mutantes aumentaron los niveles de ARNm del gen *carS* en relación a la estirpe silvestre, siendo más notable este aumento en los transformantes con la mutación $\Delta mir2$. Es interesante destacar que a pesar de los cambios en los niveles de ARNm de *carS* y de los cuatro genes del *cluster*, se seguían observando patrones de fotoinducción, por lo que las mutaciones $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$ más que afectar al mecanismo de fotoinducción, reducen los niveles globales de expresión de los genes del *cluster*. Con respecto a *carS*, al ser un regulador negativo de la carotenogénesis, la subida de los niveles de transcripción en los transformantes podría estar relacionada con la bajada en los niveles de ARNm de los genes del *cluster*, por lo que *fox-mir1* y *fox-mir2* podrían formar parte del mecanismo de regulación de la carotenogénesis mediado por *carS*.

Capítulo 2

Capítulo II. EFECTO DE LA LUZ Y LA MUTACIÓN DEL GEN *carS* SOBRE EL TRANSCRIPTOMA DE *FUSARIUM OXYSPORUM*

Introducción

La tecnología RNA-Seq es una de las herramienta más potentes disponibles actualmente en biología molecular, ya que permite conocer minuciosamente el transcriptoma completo de un microorganismo, o de incluso un tejido, mediante técnicas de secuenciación masiva (Wang et *al.*, 2009; Garber et *al.*, 2011; Egan et *al.*, 2012; Ward et *al.*, 2012). El RNA-Seq se basa fundamentalmente en la secuenciación en masa de ADNc mediante técnicas de última generación. Consiste en la obtención de muestras totales de ARN, la recuperación de los ARN mensajeros (ARNm) a partir de sus colas poliadeniladas, y la conversión de éstos en ADNc para su secuenciación. Son requisitos indispensables en esta metodología que la muestra analizada supere unos parámetros mínimos de calidad y que contenga una representación de todos los transcritos poliadenilados que se producen bajo las condiciones de estudio (Ward et *al.*, 2012). El ADNc se liga a adaptadores en sus extremos 5' y 3', que se emplearán para la secuenciación de los fragmentos. En algunos casos no se usan adaptadores, dependiendo de la plataforma de secuenciación que se emplee. Los adaptadores también son válidos si se ligan directamente a la muestra de ARN, antes del proceso de síntesis de ADNc (Core et *al.*, 2008). El ensamblaje y análisis de los datos generados por esta tecnología requiere el uso de herramientas informáticas. Habitualmente se usa el programa R, con el que se diseñó un paquete estadístico denominado DEGseq, dirigido al análisis de expresión diferencial de las muestras y condiciones tratadas (Wang et *al.*, 2010).

Aunque el concepto de expresión alude a diferentes pasos en el flujo de información desde la transcripción de un gen hasta la síntesis y maduración de la proteína que codifica, por motivos prácticos usaremos en este capítulo el término “expresión” como sinónimo de cantidad de transcrito de un gen. Usando ya así ese término, el análisis de los datos generados por la tecnología RNA-Seq permite, además de identificar los transcritos, cuantificar el nivel de expresión de cada uno de ellos. Las lecturas de un gen que se encuentren en alta cantidad representan niveles de expresión altos, mientras que las lecturas que se encuentren en bajo número, o incluso que estén ausentes, representan niveles muy bajos de expresión o ausencia de expresión (Schenk et *al.*, 2012). En los análisis de las lecturas generadas por RNA-Seq se pueden emplear diferentes parámetros estadísticos. Entre ellos destaca el cálculo de FPKM (*fragments per kilobase per million*), empleado para cuantificar niveles de transcritos, y realizar comparaciones entre muestras y/o condiciones experimentales (Mortazavi et *al.*, 2008). Otro parámetro estadístico usual en estos estudios es el llamado *fold change* de las lecturas, que corresponde a la relación entre el número de

lecturas generadas para un gen particular en una muestra en comparación con otra. De esta manera, es posible comparar la expresión de un gen entre diferentes condiciones experimentales y establecer *ratios* de expresión génica diferencial entre ellas (Auer y Doerge, 2010).

El análisis del transcriptoma es especialmente útil para comprender la función de los genes. En términos generales, si un gen se expresa en una condición determinada, significa que cumple una función en esa condición. De esta manera podemos establecer para diferentes condiciones patrones de expresión coordinada y sus posibles conexiones regulatorias.

La tecnología de RNAseq proporciona más información además de la relativa a la cuantificación de los transcritos del genoma. De particular interés es la información que aporta sobre el propio proceso de expresión de los genes, desde la ubicación de los sitios de inicio y finalización de la transcripción hasta la estructura de los exones y los posibles eventos de maduración alternativa de los intrones (Lister et al., 2009; Gullledge et al., 2012). Otra ventaja de esta técnica es que, a diferencia de la técnica de RT-qPCR cuantitativa, permite la comparación de la expresión entre diferentes genes (Nagalakshmi et al., 2008; Wang et al., 2009; Ward et al., 2012). Esto no es posible en las técnicas de RT-qPCR debido a que cada gen emplea cebadores específicos diferentes. En cuanto al método de secuenciación masiva, la plataforma Illumina es particularmente eficiente, y posiblemente es la mejor opción si se cuenta con un genoma de referencia, ya que no es necesario ensamblar el transcriptoma completo. Por otro lado, el alto número de lecturas que se generan proporciona mayor fiabilidad en la cuantificación de expresión génica y facilita la obtención de más información, por ejemplo, la detección de polimorfismos (Ozsolak et al., 2011).

La técnica de RNA-Seq ha demostrado su eficiencia en grupos taxonómicos muy diversos, desde microorganismos hasta plantas o incluso el ser humano (Filichkin, et al., 2010; Bruno et al., 2010; Mortazavi et al., 2008; Nagalakshmi et al., 2008), y se ha usado también en *Fusarium* (*F. graminearum*, Zhao et al., 2013). En este capítulo se ha empleado la técnica de RNA-Seq para profundizar en el conocimiento de la función de la proteína CarS y su relación con la regulación por luz en *F. oxysporum*.

Resultados

Efecto de la mutación *carS* y la luz sobre el transcriptoma de *F. oxysporum*

En el capítulo anterior se ha demostrado que las delecciones de dos segmentos de ADN que codifican posibles precursores de miARN dan lugar a una fuerte caída de los niveles de ARNm de los genes de la carotenogénesis en la luz. Como ya se ha

indicado, este fenotipo puede ser el resultado del aumento en los niveles de ARNm del gen *carS*, lo cual se observó en los mutantes de dichas secuencias. En este capítulo se investiga el efecto de la mutación *carS* a nivel global en el transcriptoma, y su relación con la regulación por la luz y con el fenotipo superproductor de los transformantes T2 y T3, mencionados en el capítulo anterior.

Diseño experimental

Como es frecuente con numerosas técnicas experimentales actuales, la tecnología de RNA-Seq requiere un elevado control de calidad en todos sus pasos. Los datos de RNA-Seq dependen de dos variables, la fuente biológica y la fuente técnica. El diseño experimental debe realizarse de forma que a la hora de interpretar los datos no se mezclen ambas variables (Auer y Doege, 2010).

La variación técnica y la calidad de las lecturas han sido procesadas por métodos estandarizados con la tecnología *barcoding*, que tiene en cuenta la presencia de las secuencias de los adaptadores en las lecturas. Los *barcoding* constituyen más del 20% de la lectura de secuenciación, pero la inclusión de sus secuencias proporcionan un filtro útil para eliminar lecturas erróneas en la estimación de la tasa de error de secuenciación (Degnan et al., 2012). Como fuente de información sobre el grado de variabilidad biológica, se compararon los resultados de dos réplicas de cada condición y estirpe.

Para el análisis transcriptómico se han utilizado la estirpe silvestre, dos mutantes *carS* de *F. oxysporum* (SX1, SX2), y los dos transformantes superproductores de carotenoides obtenidos por inserción de ADN-T, T2 y T3, ya investigados en el capítulo anterior. Las condiciones de cultivo son las descritas en los ensayos de RT-qPCR mencionados en la Figura C1.8, es decir, una incubación de 3 días en oscuridad en cultivos líquidos de medio mínimo DGasn líquido. En el caso de la estirpe silvestre, tras estos tres días de incubación, el cultivo se expuso una hora a la luz. Este tiempo de iluminación se eligió por ser el que produce un incremento mayor de los transcritos de los genes del *cluster car* (Avalos y Estrada, 2010). Los cultivos de las cinco estirpes se realizaron en paralelo, con dos réplicas biológicas independientes. En total se analizaron 12 muestras (5 muestras incubadas en oscuridad y 1 muestra incubada en luz, por duplicado).

Control de calidad de las muestras de ARN

En todo análisis de RNA-Seq, es necesario evaluar previamente la calidad de las muestras de ARN empleadas (Figura C2.1), así como la de los propios datos de la secuenciación (Levin et al., 2010, van Verk et al., 2013, Zhou et al., 2013). El ARN total de cada muestra se extrajo con el método del TRIzol, las muestras se trataron con

ADNasa y se purificaron a continuación con un kit comercial (ver detalles en Material y Métodos).

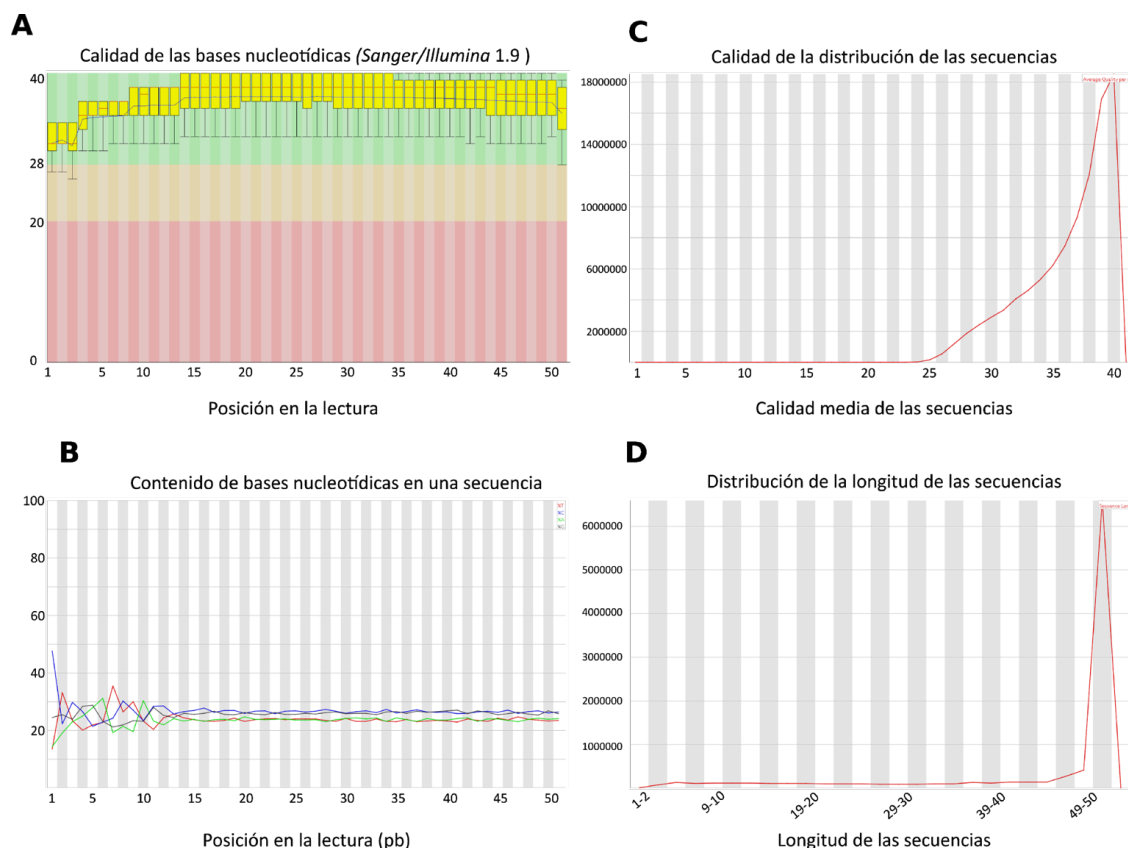


Figura C2.1. Ejemplo de calidad de las muestras según los parámetros visualizados a través del programa FastQC. Solo se representan los gráficos para una de las muestras, en este caso la correspondiente a la estirpe silvestre incubados en oscuridad (REFERENCIA 150028). **A** Representación de calidad según la posición nucleotídica para todas las lecturas detectadas en la secuenciación. El análisis corresponde a fragmentos de unas 50 pb de longitud, en las cuales no se detectan problemas de calidad apreciables a lo largo de las lecturas. La línea azul representa los valores medios y la línea roja la mediana. Todas las lecturas se sitúan en la franja verde, confirmando su calidad. **B** Distribución del contenido de bases. Se aprecia una distribución uniforme, sin desviaciones excepto en un bajo número de secuencias debido al problema de eliminación de adaptadores en el extremo 5'. Esto es algo usual en el método y no altera los resultados. **C** Medición de la calidad media de cada lectura. El eje de abscisas representa la calidad y el eje de ordenada las lecturas. Todas las lecturas tienen un índice de calidad superior a 30. Las secuencias con valores inferiores a 20 indican problemas de calidad. **D** Medición de la calidad con respecto a la técnica de secuenciación. El eje de ordenadas también representa las lecturas. Se observa que la inmensa mayoría de las lecturas se sitúa en torno a 50 bases.

La calidad e integridad de las muestras de ARN se evaluó por espectrofotometría y visualización en gel de agarosa y las muestras se enviaron para su secuenciación en masa a la empresa LifeSequencing (Valencia). Antes de su uso para la secuenciación, los técnicos de la empresa evaluaron la calidad de las muestras

proporcionadas calculando su valor RIN, un parámetro basado en la cuantificación de los productos de degradación de ARN tras su migración en una electroforesis. Los valores de RIN pueden oscilar entre 1 y 10, siendo necesario un valor mínimo de 8 para proceder con la secuenciación (Schroeder et al., 2006). Los valores de RIN de las muestras enviadas oscilaron entre 9.7 y 10 (Tabla 4, Materiales y Métodos). No se observaron indicios de degradación y los ARN ribosómicos 18S y 20S se detectaron en una relación correcta.

Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma Illumina (Metzker, 2010). La tecnología empleada no requiere el ensamblaje del transcriptoma completo, ya que es suficiente una baja proporción de lecturas de transcritos pequeños para detectar la expresión de un gen sin necesidad de detectar un transcrito largo. Por su alta eficiencia, la metodología Illumina proporciona un número de lecturas suficientemente elevado para garantizar la fiabilidad de los datos de cuantificación de la expresión génica. Las lecturas obtenidas y sus características básicas se describen en la tabla C2.1.

Tabla C2.1. Características básicas de las muestras y rendimiento de las lecturas.

Muestra	Nº Lecturas (x10 ⁶)	Lecturas mapeadas (%)	Contenido G+C (%)	Longitud media de lecturas	Calidad *
WT osc (1)	11.97	90.4	53	43.70	35.22
WT osc (2)	9.71	91.5	52	43.96	35.27
WT luz (1)	8.91	91.1	52	43.76	35.19
WT luz (2)	10.41	91.5	52	43.99	35.29
T2 osc (1)	9.23	91.5	52	43.05	35.26
T2 osc (2)	9.09	91.3	52	43.12	35.31
T3 osc (1)	10.37	91.2	53	42.94	35.28
T3 osc (2)	8.72	91.4	52	43.13	35.20
SX1 osc (1)	11.50	91.0	52	43.93	35.29
SX1 osc (2)	10.49	91.2	52	43.97	35.30
SX2 osc (1)	8.76	91.4	52	43.94	35.27
SX2 osc (2)	9.72	90.7	52	43.84	35.27

*Calidad referida a la posición nucleotídica para todas las lecturas detectadas en la secuenciación.

El genoma de referencia (*Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici* 4287; assembly ASM14995v2, NCBI) tiene un contenido global G+C del 47.6%, y los marcos abiertos de lectura (ORFs) anotados representan el 51,7% del genoma. Las secuencias obtenidas en nuestro estudio de RNA-Seq tienen un contenido medio G+C próximo a 52%, que en comparación con el valor global de 47,6% indica un mayor porcentaje G+C en las regiones codificantes que en las no codificantes. Con respecto a la calidad de las secuencias, el análisis se realizó con el paquete FastQC, una herramienta de control de calidad para secuenciaciones masivas que ofrece el Instituto Babraham (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Este análisis arrojó perfiles similares para todas las muestras (ejemplo en Figura C2.1).

Los datos globales de las secuencias en relación con el genoma anotado identificaron transcritos para 17.999 genes, con 18.097 isoformas, asignables a 17.687 secuencias codificantes. El número de inicios de transcripción identificados fue de 1.501. El programa detectó un número muy elevado de *splicing* alternativos (226.515), lo que sugiere que la maduración alternativa de intrones es un fenómeno frecuente en *F. oxysporum*.

Análisis de la expresión génica

Una vez calibrada la calidad de las lecturas, se procedió a asignar valores de expresión a cada gen en las distintas muestras analizadas, utilizando para ello el protocolo “Tuxedo” (Material y Métodos). La representación de los datos de expresión corregidos para cada *gen* y expresados como FPKM en un gráfico tipo *boxplot* (Figura C2.2 A) muestra un elevado paralelismo entre todas las muestras, especialmente de las réplicas biológicas entre sí, con medias (trazo central cada caja) y cuartiles muy similares. A partir de este momento, se considera cada condición y estirpe por separado utilizando la media de las dos réplicas como valor de expresión en cada condición experimental.

La representación global de la variación entre las réplicas (CV^2) en función de los niveles de expresión, expresados como FPKM, muestra un grado de repetitividad creciente a medida que aumenta la expresión (Figura C2.2 B). Las distribuciones fueron parecidas en las diferentes estirpes y condiciones de cultivo.

Análisis de expresión diferencial: efectos de la mutación *carS* y de la luz

Con el objetivo de identificar los genes con diferencias significativas en los niveles de expresión de sus transcritos en las distintas condiciones ensayadas, se utilizó un valor *p* de 0,05. Una vez definido como umbral, este valor nos proporciona el dato

de significancia y suele oscilar entre 0,1 y 0,01. Los valores p son estadísticos y se obtienen a partir de la t de *student*, que tienen en cuenta la media entre réplicas y su varianza.

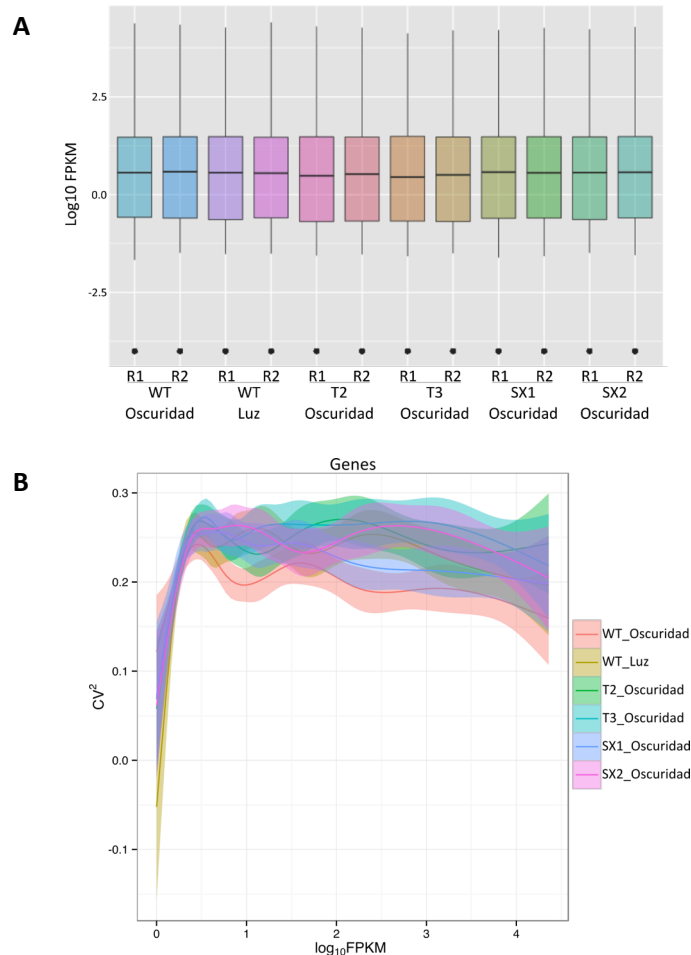


Figura C2.2. Análisis global de expresión de las muestras. **A** Representación *boxplot* de las muestras empleadas en el estudio. Las cajas representan el 50% de la variación (± 1 cuartil), y el trazo interior indica la media. **B** Distribución global de la expresión de los genes entre las réplicas biológicas en función de los valores de dicha expresión. La línea interior indica el valor medio de variación. CV^2 : coeficiente de variación para medir la dispersión entre las lecturas. Se utilizó el protocolo Tuxedo.

Como criterio de expresión diferencial se utilizó un factor de 2, tanto de activación como de represión, que en función del logaritmo en base 2 corresponde a un valor de logaritmo igual a 1. Aquellos genes cuyo cambio en los niveles de expresión (originalmente denominado *fold-change*) sea superior a este umbral se considerarán activados, y aquellos con un valor inferior al valor umbral, reprimidos. El empleo de un umbral relativamente bajo asegura que no se descarte ningún posible efecto regulatorio, aunque dicho efecto será lógicamente más significativo a medida que aumenta el valor de expresión diferencial.

Atendiendo al criterio mencionado, se indican en la tabla C2.2 el número de genes activados y reprimidos como consecuencia de la luz o de la mutación *carS* en las distintas combinaciones de interés. Dado que los mutantes *carS* SX1 y SX2 pueden tener mutaciones secundarias, solo se interpreta como activaciones o represiones atribuibles a la mutación *carS* aquellas que coinciden en las dos estirpes. Por otro lado, aunque sus fenotipos no son plenamente coincidentes, se ha utilizado el mismo criterio con los transformantes T2 y T3 para identificar aquellos genes que se vean afectados en ambas estirpes.

El análisis de los datos de la tabla muestra un número muy elevado de genes afectados por la luz, superando el 3% del número total de genes del genoma, siendo la proporción sensiblemente más baja para los genes reprimidos. El efecto de la luz es mayor que el impacto de la mutación *carS*, con un número de genes activados que no alcanza el 2%, superando de nuevo el número de genes activados al de reprimidos. La situación se invierte sin embargo para los genes con la expresión alterada en los transformantes T2 y T3, con casi un 4% de genes reprimidos, más del doble que los activados.

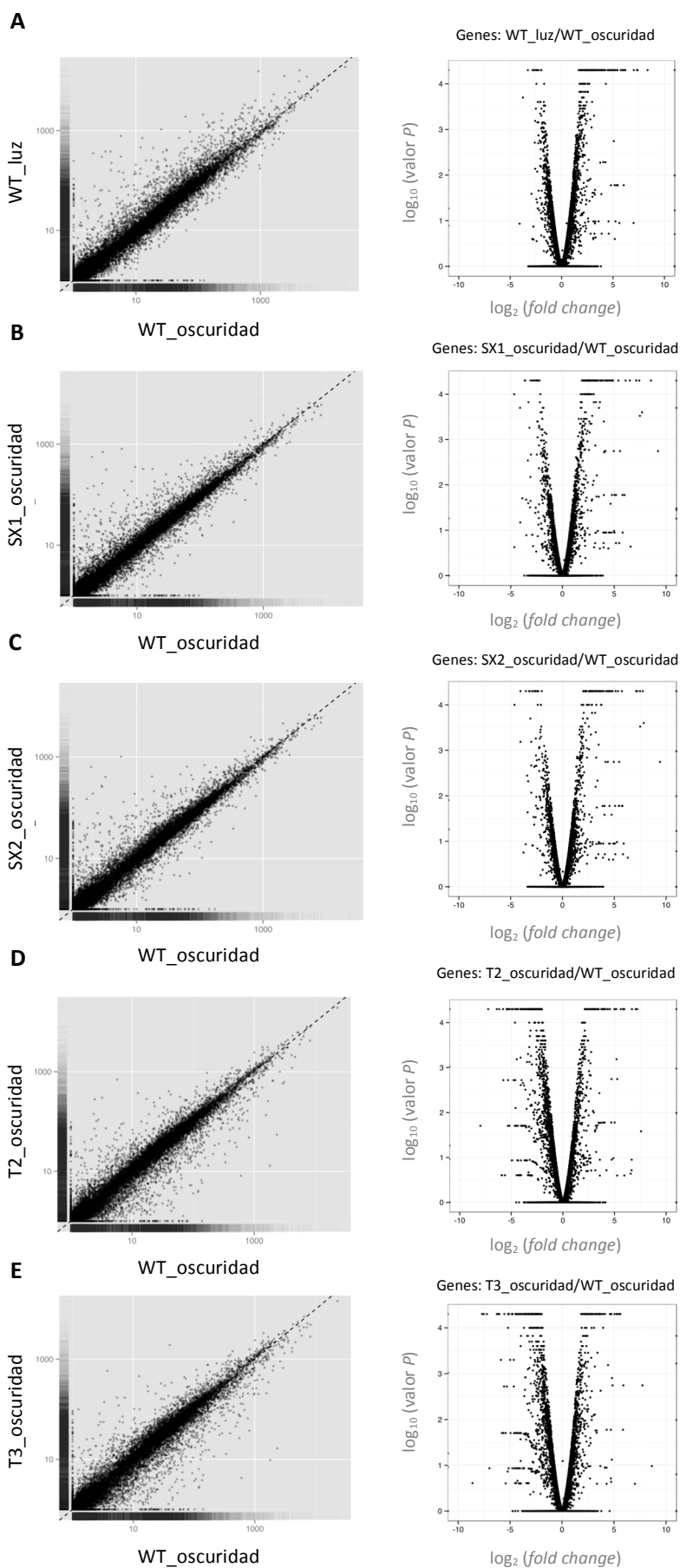
Tabla C2.2. Número de genes cuya expresión varía significativamente en las condiciones indicadas

	Activados	%*	Reprimidos	%
Efecto de la luz en la estirpe silvestre	607	3,3	357	1,9
Efecto de la mutación <i>carS</i> (SX1/SX2)	343	1,9	217	1,2
Efecto de las inserciones de ADN-T en T2/T3	294	1,6	710	3,9

* Los porcentajes se refieren respecto al número total de genes en el genoma.

La mayoría de los genes activados y reprimidos como consecuencia de la luz o de la mutación *carS* muestran cambios menores en los niveles de expresión. Esto se aprecia en las gráficas de comparaciones de dos condiciones, en los que cada punto representa un gen (Figura C2.3). Las gráficas muestran que la mayoría de los genes con expresión diferencial se concentran en la región próxima al umbral elegido (Figura C2.3 A, B y C). La observación detallada de estos gráficos aporta más información. En concordancia con la tabla C2.2, se aprecia un número mayor de genes inducidos que de reprimidos por la luz. Sin embargo, en el gráfico se puede apreciar que el número de genes con cambios importantes en los niveles de expresión es mucho mayor entre los genes inducidos que entre los reprimidos. También se observa que la predominancia de genes activados entre los que han sufrido los mayores cambios de expresión, tanto como resultado de la iluminación como la mutación *carS*, se invierte en los transformantes T2 y T3, en los que es patente una predominancia de genes

reprimidos entre los más afectados (Figura C2.3 D y E). Este resultado no es sorprendente, ya que, como se ha visto en el capítulo anterior, los transformantes T2 y T3 no están mutados en el gen *carS* y su fenotipo es debido a las alteraciones genómicas producidas por las integraciones de ADN-T en la región genómica de *carS*. Debe tenerse en cuenta además que, mientras que el fenotipo de los mutantes SX1 y SX2 se puede atribuir a sus mutaciones en el gen *carS*, los transformantes T2 y T3 difieren tanto en el fenotipo (T3 acumula menos carotenoides que T2, especialmente en la oscuridad) como en el genotipo (las inserciones de ADN-T han ocurrido en sitios diferentes, y T2 muestra una alteración adicional que no está aún bien caracterizada). No es extraño por tanto, que la comparación entre la expresión de los genes en SX1 y SX2 (Figura C2.3 F) dé menos diferencias que la comparación entre T2 y T3 (Figura C2.3 G).



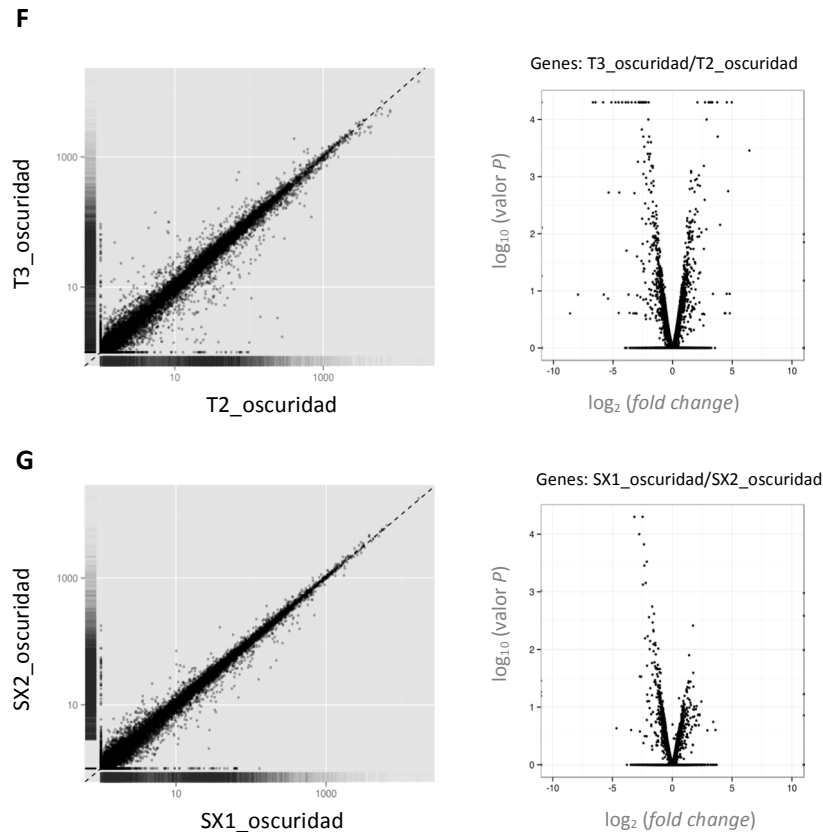


Figura C2.3. Comparaciones de los transcriptomas de la estirpe silvestre y los mutantes superproductores de carotenoides. A Efecto de la luz en la estirpe silvestre (silvestre luz vs silvestre oscuridad). **B** Efecto de las alteraciones genéticas de SX1 (Mutante SX1 oscuridad vs Silvestre oscuridad). **C** Efecto de las alteraciones genéticas de SX2 (Mutante SX2 oscuridad vs estirpe Silvestre oscuridad). **D** Efecto de las alteraciones genéticas del transformante T2 (Mutante T2 oscuridad vs Silvestre oscuridad). **E** Efecto de las alteraciones genéticas del transformante T3 (Mutante T3 oscuridad vs Silvestre oscuridad). **F** Comparación entre los transformantes T2 y T3 (T2 oscuridad vs T3 oscuridad). **G** Comparación entre los mutantes SX1 y SX2 (SX1 oscuridad vs SX2 oscuridad). Las gráficas de la izquierda se representaron como *Scatter plot* y los de la derecha como *Volcano plot*.

En la Figura C2.3 se representan por separado las alteraciones en los transcriptomas de los mutantes SX1 y SX2. Sin embargo, como ya se ha indicado, solo se han considerado como atribuibles a la mutación *carS* los cambios en la expresión de los transcritos coincidentes en ambas estirpes. Ese filtro descarta un número elevado de genes (Figura C2.4 A), tanto para la inducción como para la represión. Aunque no se pueden descartar diferencias en mutaciones secundarias, la causa más probable es que la mayoría de los genes que aparecen como inducidos o reprimidos se encuentran cerca del umbral de 2x. Tanto por error experimental, como por oscilaciones biológicas reales, cabe esperar que muchos de ellos solo hayan superado el umbral en una de las dos estirpes.

Un resultado parecido se observa al examinar el número de genes coincidentes entre aquellos activados en los transformantes T2 y T3 (Figura C2.4 B), aunque en este caso se puede atribuir también a las diferencias en las alteraciones moleculares en sus genomas. Sin embargo, contra lo que cabría esperar teniendo en cuenta las diferencias fenotípicas entre ambas estirpes, el grado de coincidencia entre los transformantes T2 y T3 es muy elevado para los genes reprimidos.

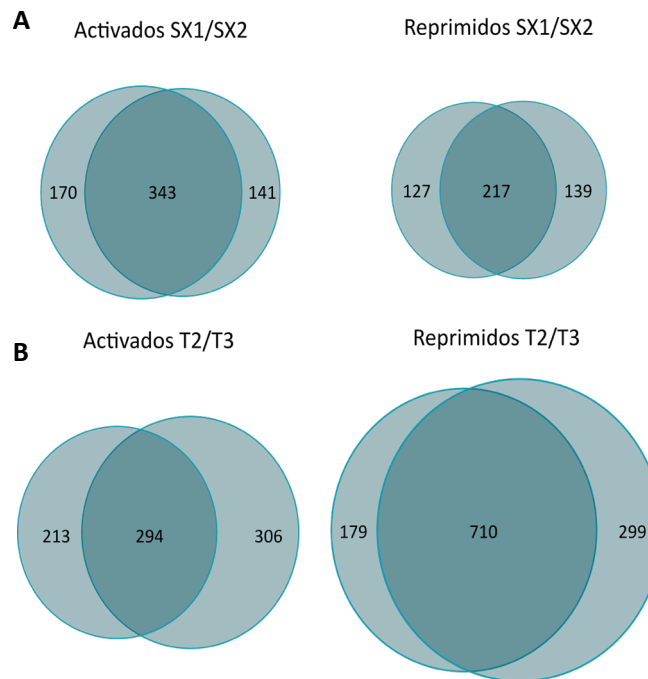


Figura C2.4. Números de genes activados y reprimidos en la estirpe silvestre y los mutantes *carS* en oscuridad. **A** Genes activados y reprimidos de los mutantes SX1 y SX2 frente a la estirpe silvestre, en oscuridad. **B** Genes activados y reprimidos en los transformantes T2 y T3 frente a la estirpe silvestre, en oscuridad. La intersección en cada diagrama de Venn representa el número de genes comunes entre ambas estirpes. Las áreas de los círculos están dibujados a escala.

La luz y la mutación *carS* dan lugar a un aumento en la transcripción de los genes estructurales de la carotenogénesis. Sin embargo, el número de genes afectados por ambos factores regulatorios es mucho mayor, especialmente en el caso de la luz (Tabla C2.2). A pesar de ello, el análisis del solapamiento de los genes inducidos por ambos factores indica un grado de coincidencia mucho más elevado que el esperado por azar, lo cual apoya la existencia de conexiones regulatorias entre el mecanismo molecular de control por la luz y la función de la proteína CarS (Figura C2.5).

Por el contrario, el grado de solapamiento es más reducido en el caso de los genes reprimidos, aunque aún es más alto que lo que se esperaría por azar. En este caso, es especialmente llamativo que aproximadamente un 33% de los genes cuyos

transcritos bajan por efecto de la mutación *carS*, también lo hacen por efecto de la luz, un porcentaje no muy lejos del porcentaje observado para los genes activados por la mutación *carS* y a su vez por la luz: 41%.

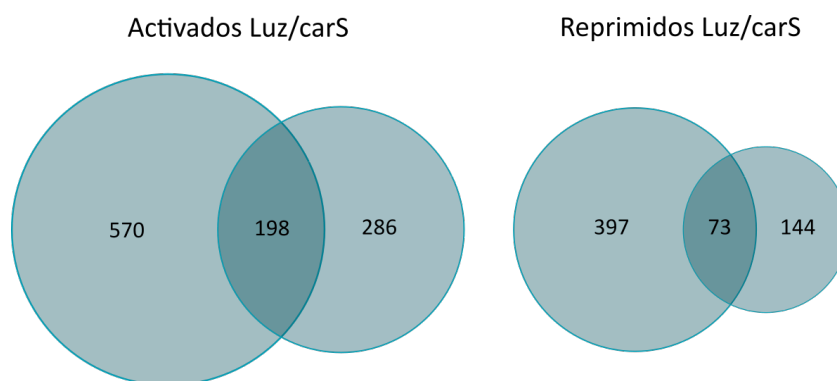


Figura C2.5. Comparación de los genes activados o reprimidos por la luz en la estirpe silvestre y los genes activados o reprimidos en los dos mutantes *carS*. La intersección en cada diagrama de Venn representa el número de genes comunes entre ambas condiciones.

Identidad de los genes regulados por la luz y por CarS

Los genes cuyos niveles de ARNm cambian por efecto de luz o de la mutación *carS* se ordenaron por su grado de activación o represión y se identificaron en el proteoma de *F. oxysporum*. La lista completa de todos los genes se muestra en el Anexo I. En las tablas C2.3 y C2.4 se describen los 10 genes con mayor grado de activación o de represión en cada estirpe o condición, así como el cambio relativo (CR ó *Fold Change*). La mayor parte de los genes identificados no codifican proteínas de funciones predecibles (indicadas como *Proteína hipotética*), aunque en algunos casos se puede identificar la presencia de dominios conservados.

Tabla C2.3. Genes cuyos niveles de ARNm sufren los mayores cambios por efecto de la luz. *CR (Cambio Relativo)

Genes con el mayor grado de activación por la luz			
Gen	CR*	Identidad	Dominios conservados
FOXG_11750	329,50	Proteína hipotética	Ferritina_2
FOXG_12144	167,54	CarRA	Sintasa de escualeno/fitoeno
FOXG_12143	165,60	CarB	Amino_oxidasa Amino_oxidasa
FOXG_12142	161,53	CarO	Bacteriorrodopsina
FOXG_13071	130,15	Proteína hipotética	Proteína de unión a oxisterol
FOXG_16481	127,99	Blh4	Super familia SDR
FOXG_09735	73,30	Oxidorreductasa	Oxidorreductasa_FMN/YadA_stalk
FOXG_12145	70,40	CarX	RPE65/PPI_Ypi1

FOXG_03802	65,67	Proteína hipotética	GFA
FOXG_03570	63,63	Proteína hipotética	ADN_Fotoliasa/Unión a FAD_7

SDR: Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta

GFA: Enzima activadora de formaldehído dependiente de glutatión

SQS_PSY: Sintasa de escualeno/fitoeno

Genes con el mayor grado de represión por la luz

Gen	CR	Identidad	Dominios conservados
FOXG_02583	0.058	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_05815	0.074	Oxidasa de L aminoácido	Amino_oxidasa/ARL2_Bind_BART
FOXG_15250	0.103	Proteína hipotética	BglX /Glyco_hydro_3
FOXG_13112	0.131	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_14203	0.138	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_00752	0.140	Proteína hipotética	NnrS
FOXG_07463	0.141	Proteína hipotética	Aldedh
FOXG_10673	0.148	Proteína hipotética	Helo_like_N/DUF2290
FOXG_03894	0.149	Proteína hipotética	Fungal_trans
FOXG_06170	0.150	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>

NnrS: Proteína grupo hemo con cobre

Fungal_trans: Factor de transcripción específico de hongos. Factor de transcripción con cluster de Zn.

Tabla C2.4. Genes cuyos niveles de ARNm sufren los mayores cambios por efecto de la mutación *carS*.

CR: Cambio Relativo

Genes con el mayor grado de activación por la mutación *carS*

Gen	CR	Identidad	Dominios conservados
FOXG_02914	681,13	Proteína hipotética	DUF2278 LTD
FOXG_02907	230,12	Proteína hipotética	MviM Superfamily
FOXG_12143	215,97	CarB	Fitoeno deshidrogenasa
FOXG_02910	180,58	Proteína hipotética	Aspartato aminotransferasa
FOXG_12144	178,62	CarRA	Isoprenoid-Byosin C1
FOXG_11750	178,06	Proteína hipotética	Ferritina_2
FOXG_12142	147,45	CarO	YRO-2 Fungal like
FOXG_02920	137,40	Quitosanasa	Glyco_hydro_75 Superfamily
FOXG_02853	78,69	Proteína hipotética	Superfamilia SDR
FOXG_16481	60,07	Proteína hipotética	adh_short adh_short

Genes con el mayor grado de represión por la mutación *carS*

Gen	CR	Identidad	(Dominios conservados)
FOXG_11986	0.040	Deshidrogenasa de colina	Pyr_redox_2/PhoPQ_related/GMC_oxred_C
FOXG_11987	0.060	Proteína hipotética	CFEM DUF308
FOXG_10691	0.060	Proteína hipotética	MANEC PAN_4 MANEC PAN_4
FOXG_02448	0.073	Proteína hipotética	No encontrado
FOXG_09634	0.085	Proteína hipotética	No encontrado
BAE97121.1	0.086	PG5. Endopoligalacturonasa	Glyco-hydro 28
FOXG_16516	0.094	Proteína hipotética	Pec_liaa_C
FOXG_04683	0.097	Proteína hipotética	No encontrado
FOXG_13304	0.100	Proteína hipotética	Peroxidasa_2
FOXG_11988	0.107	Proteína hipotética	Peroxidasa_2

Entre los genes más fuertemente activados por la luz y por la mutación *carS* se encuentran los del *cluster car* (*carX*, *carRA*, *carB* y *carO*). Este resultado confirma que este *cluster* es uno de los objetivos principales de la regulación por la luz y por el mecanismo mediado por la proteína CarS. Los efectos de la luz y de la mutación *carS* sobre la expresión de los genes *car* se resumen en la tabla C2.5 y se representan los niveles de cantidad de ARNm en FPKM en la figura C2.6. Los datos confirman además cambios más moderados por la luz y la mutación *carS* sobre la expresión del gen estructural *carT*, y muy poca influencia sobre los genes *carD* y *ggs1*, todos ubicados fuera del *cluster car*. Con respecto al gen regulador *carS*, la activación de la expresión no llega a ser el doble ni por la luz ni por la mutación *carS*.

Tabla C2.5. Activación transcripcional por luz y por la mutación *carS* de los genes del *cluster car*, de los genes estructurales *carD*, *carT* y *ggs1*, y del propio gen regulador *carS*. CR: Cambio relativo.

Identidad	ID	Efecto de la luz (CR)	Efecto de la mutación <i>carS</i> (CR)
<i>carRA</i>	FOXG_12144	167,54	178,62
<i>carB</i>	FOXG_12143	165,60	215,97
<i>carO</i>	FOXG_12142	161,53	147,45
<i>carX</i>	FOXG_12145	70,40	41,34
<i>carT</i>	FOXG_10608	22,22	11,96
<i>carD</i>	FOXG_05463	1,11	1,43
<i>carS</i>	FOXG_09307	1,86	1,57
<i>ggs1</i>	FOXG_05311	2,96	2,85

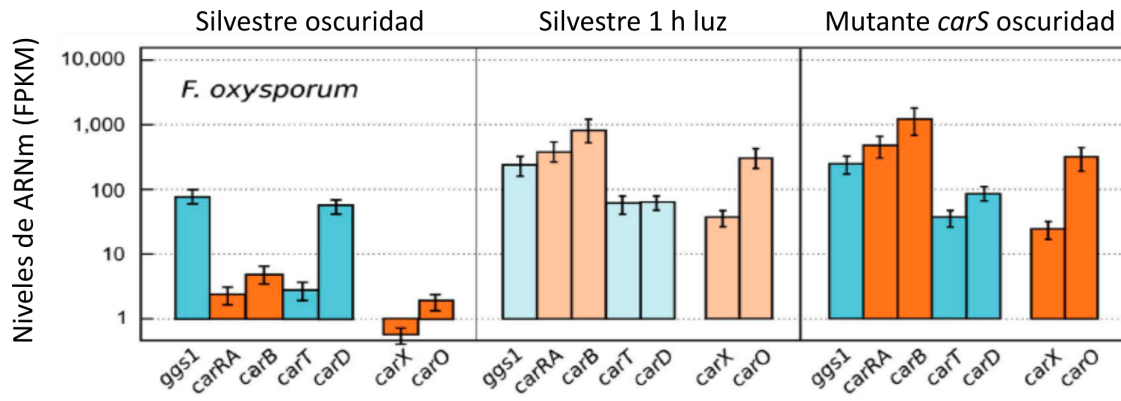


Figura C2.6. Efecto de la luz y la mutación *carS* en los niveles relativos de ARNm de los genes implicados en el metabolismo de carotenoides en *F. oxysporum*. Los genes se han agrupado de acuerdo a sus funciones, *ggs1*, *carRA*, *carB*, *carT* y *carD* para la biosíntesis de NX, y *carX* y *carO* para la biosíntesis de retinal. Modificado de Avalos et al., 2017.

Categorías funcionales de los genes activados por la luz y por la mutación *carS*

El elevado número de genes cuya expresión se ve alterada por la mutación *carS* indica que la función de la proteína CarS no se limita al control del *cluster car*, sino que se extiende a otras funciones en el hongo. La misma conclusión se puede aplicar al efecto de la luz, más aún considerando que influye sobre una batería más extensa de genes. A fin de obtener una visión global del efecto de la luz y de la mutación *carS*, se clasificaron los genes en grupos funcionales de acuerdo con las categorías definidas por el *Gen Ontology Consortium* (<http://geneontology.org>). Estas categorías, conocidas como GO, se basan en las actividades moleculares, los componentes celulares donde las proteínas son activas y las rutas o procesos biológicos en las que participan, y pretenden hacer una visión unificada para todos los seres vivos.

El protocolo de asignación de categorías se basa en la identificación de dominios Pfam (Punta et al., 2012), organizados en una base de datos que acumula información sobre alineamientos y estructuras proteicas conocidas. Este método no asigna dominios Pfam a todas las proteínas, ya que la asignación de dominios debe cumplir unos mínimos de identidad en los alineamientos. En el caso del proteoma de *F. oxysporum*, solo se encuentra al menos un dominio Pfam significativo en aproximadamente el 50% de las proteínas predichas en su proteoma. La distribución de funciones GO más representativas en las proteínas deducidas de los genes cuyos niveles de ARNm aumentan por efecto de la luz o de la mutación *carS* dentro de este 50%, y a las que se asignan un valor de parámetro Fisher igual o menor a 0.05, se describen en la figura C2.7.

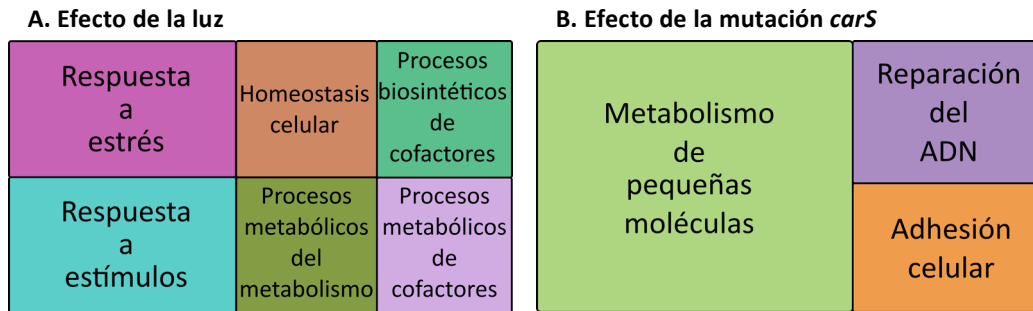


Figura C2.7. Representación REVIGO (*Gene Ontology treemap*) de la distribución de grupos funcionales de las proteínas identificadas con dominios PFAM significativos. **A** Grupos funcionales entre las proteínas de genes activados por la luz. **B** Grupos funcionales entre las proteínas de genes activados por la mutación *carS*

El análisis de enriquecimiento ontológico a través de la representación REVIGO reveló que el grupo funcional más significativo de los genes activados por la luz fue para los de respuesta a estímulos, incluyendo estímulos de estrés. Sin embargo, el grupo funcional más significativo de los genes activados por la mutación *carS* está asociado al metabolismo de pequeñas moléculas. Estas diferencias pueden ser atribuidas, al menos parcialmente, al bajo número de genes clasificados en *F. oxysporum* y al solapamiento entre varias categorías GO.

Análisis del transcrito del gen *carS*

Los datos de RNA-Seq proporcionan información sobre la longitud e integridad de los transcritos de todos los genes expresados. En el análisis de los datos se prestó especial atención al transcrito del gen *carS* (*Foxg_09307*). La visualización de la cobertura de las lecturas de RNA-Seq respecto al ORF del gen *carS* indica un inicio de la transcripción muy próximo al codón de inicio de la secuencia codificante, mientras que la transcripción se extiende aproximadamente 350 bases más allá del codón de terminación predicho, en ambos casos de acuerdo con la anotación del genoma (EnsemblFungi.fungi.ensembl.org/index.html) (Figura C2.8 A, marca roja discontinua). Las secuencias obtenidas del transcrito *carS* en el análisis de RNA-Seq en la estirpe silvestre, tanto en la oscuridad como tras una hora de iluminación, aporta información sobre la maduración de los dos intrones predichos en la anotación del gen en el genoma. El primer intrón no se procesó normalmente en nuestras muestras, y de hecho se corresponde con una secuencia que contiene el segundo dominio RF (Figura C2.8 A, marca verde continua, y C2.8 B). Respecto al segundo intrón anotado, se procesa en casi todas las lecturas, (Figura C2.8 A, marcas verdes) aunque, en algunos casos ocasionalmente no se procesa. Tanto para el primero como el segundo intrón, se desconoce si las variaciones observadas podrían constituir un mecanismo controlado de maduración alternativa.

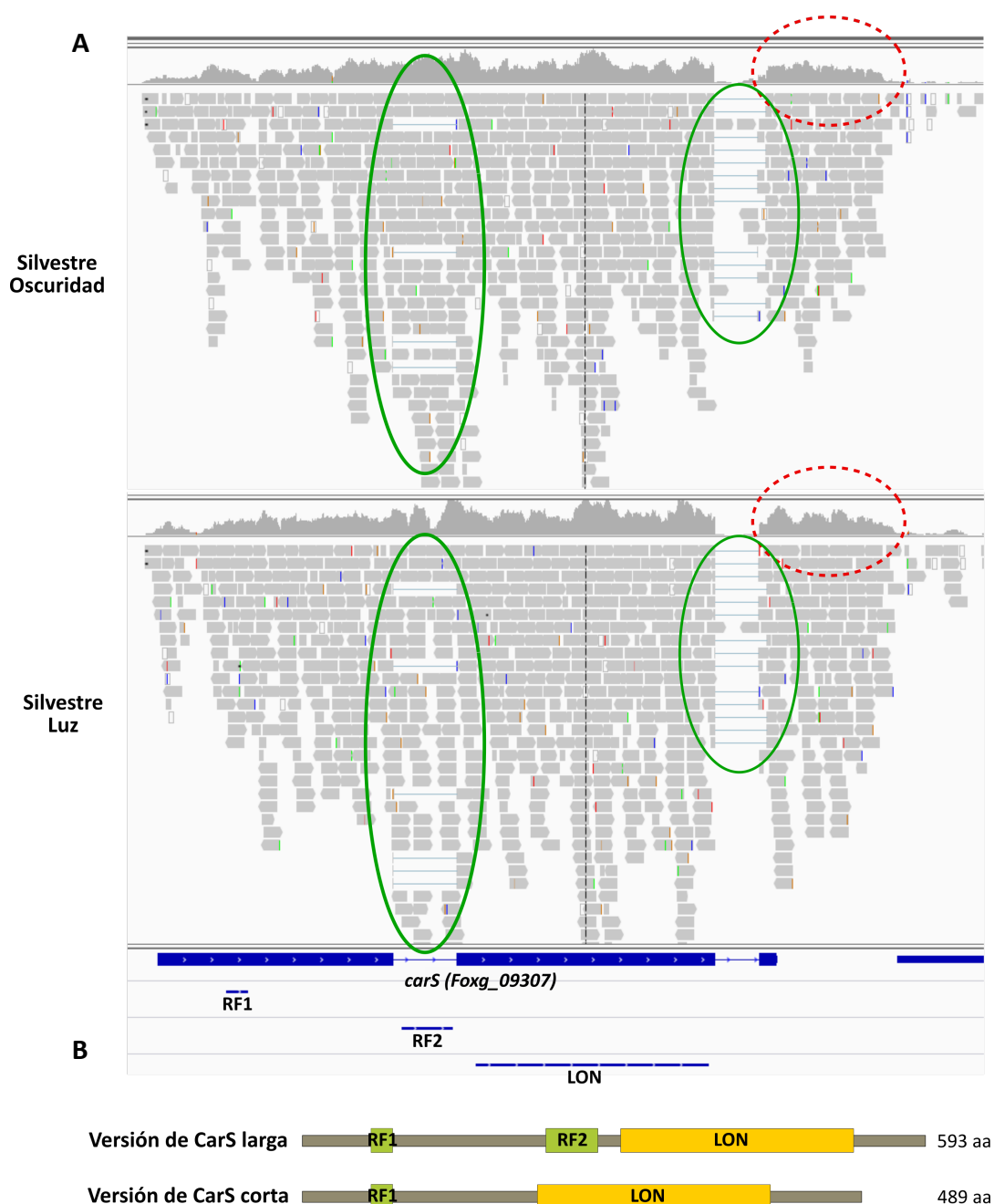


Figura C2.8. Representación mediante la plataforma IGV (*Integrative Genomics Viewer*) de las lecturas de los transcritos obtenidos en el análisis de RNA-Seq del gen *Foxg_09307* (*carS*). **A** Lecturas en una de las muestras de la estirpe silvestre en oscuridad (arriba) o tras una hora de luz (abajo). Se indica con una marca roja de trazo discontinuo la región transcrita posterior al supuesto codón de terminación, y con marcas verde de trazo continuo los posibles procesamiento alternativo de ambos intrones en el transcrito de *carS*. **B** Representación de la proteína CarS según la secuencia proteica disponible en el NCBI y la correspondiente maduración alternativa del segundo intrón.

Análisis de la región genómica próxima al gen *carS* en los transformantes T2 y T3

En los datos proporcionados por el análisis de RNA-Seq se prestó especial atención a la región intergénica entre el gen *Foxg_09306* y el gen *carS* de *F. oxysporum*, tanto por haber sufrido alteraciones en los transformantes T2 y T3 como por la presencia de secuencias para posibles precursores de miRNAs, ya discutidos en el Capítulo 1. Es oportuno recordar que el transformante T2 manifiesta un fenotipo muy similar al de los mutantes *carS* SX1 y SX2, a pesar de no poseer mutaciones en el gen *carS*.

Los datos de RNA-Seq mostraron una fuerte disminución de la actividad transcripcional de una región de aproximadamente 12 kb del genoma de los transformantes T2 y T3, siendo dicho silenciamiento especialmente claro en T2 (Figura C2.9 A). La región silenciada es adyacente, y posiblemente parcialmente solapante, con las secuencias alteradas en ambos transformantes en el largo segmento intergénico entre *Foxg_09306* y *Foxg_09307* (Rodríguez-Ortiz, 2012) y abarca los genes *Foxg_09307* (*carS*), *Foxg_09308*, *Foxg_09309*, *Foxg_17768* y *Foxg_09312*.

El silenciamiento no afectó sin embargo ni al gen *Foxg_09306* ni a otras regiones adyacentes a ambos extremos de la secuencia silenciada. Además, se observó un aumento en los niveles de ARNm del gen *Foxg_09306* en T2 con respecto al resto de las estirpes (Figura C2.9 B y C). La alteración genómica de T2 está localizada cerca del promotor de este gen, lo cual puede estar relacionado con el observado aumento de su transcripción.

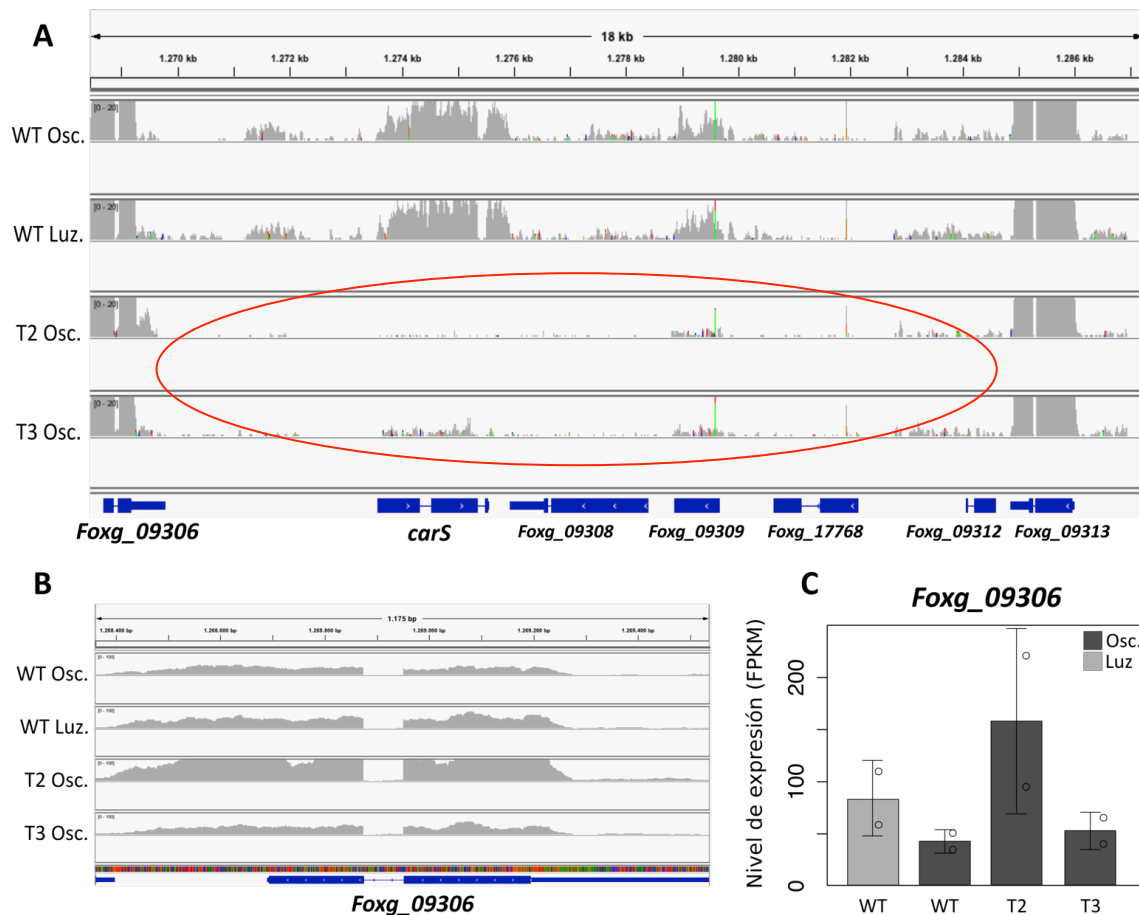


Figura C2.9. Niveles de los transcritos de las proximidades al gen *carS* en la estirpe silvestre, los mutantes *carS* SX1 y SX2 y los transformantes T2 y T3 obtenidos por RNA-Seq. **A** Lecturas de la región comprendida entre *Foxg_09306* y *Foxg_09312*, donde se muestra la pérdida de transcritos de dicha zona en los transformantes T2 y T3, con respecto a la estirpe silvestre y los mutantes SX1 y SX2. **B** Perfiles de expresión del gen *Foxg_09306*. **C** Niveles de ARNm del gen *Foxg_09306* expresados como FPKM en la estirpe silvestre y los transformantes T2 y T3. Las estirpes se incubaron 3 días en oscuridad. Los gráficos A y B se representaron mediante el programa IGV.

El elevado número de genes reprimidos en los transformantes T2 y T3 (Tabla C2.2) sugiere que el silenciamiento puede afectar también a otras regiones del genoma. Esta predicción se ha comprobado visualizando los 30 primeros genes con mayor represión en estos transformantes, de los cuales en varios casos tienen reprimidas las regiones genómicas en las que están localizados (Tabla C2.6). En algunos casos la región genómica silenciada alcanza los 40 kb de secuencia (Figura C2.10).

Tabla C2.6. Genes con mayor grado de represión compartidos por los transformantes T2 y T3

Gen	CR	Identidad	Dominios conservados
FOXG_10691	0.0039	Proteína hipotética	Dominio PAN
FOXG_09107	0.0066	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_02668**	0.0117	Proteína hipotética	Citocromo P450
FOXG_11969*	0.0163	Proteína hipotética	Citocromo P450
FOXG_14466*#	0.0166	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_09307*	0.0179	<i>carS</i>	RING y LON
FOXG_10935**	0.0183	Proteína hipotética	TRI 12
FOXG_15014*	0.0203	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_11701	0.0227	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_13024**	0.0229	Proteína hipotética	Superfamilia de unión a AMP
FOXG_11784****	0.0238	Proteína hipotética	Superfamilia de transportadores de azúcares
FOXG_14564*	0.0239	Proteína hipotética	Asociado a peptidasa-proteasa
FOXG_15372**	0.0247	Proteína hipotética	Retinol deshidrogenasa
FOXG_11986**	0.0249	Deshidrogenasa de colina	GMC-Oxidoreductasa. NADB
FOXG_11783****	0.0254	Proteína hipotética	Superfamilia de ciclasas
FOXG_00784	0.0260	Proteína hipotética	Superfamilia de VirB4
FOXG_05449	0.0275	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_17778	0.0282	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_12958*	0.0323	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_06050	0.0325	Proteína hipotética	SDR tipo NmrA
FOXG_10933	0.0326	Proteína hipotética	Alquil hidropoxidasa
FOXG_04016	0.0346	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_15242>****	0.0365	Proteína hipotética	Reductasa tipo Enoy
FOXG_03933***	0.0395	Proteína hipotética	CzcO. Ryr-redox_2
FOXG_02669	0.0400	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_09843	0.0402	Descarboxilasa de oxalato	Bicupin_oxidic
FOXG_13026	0.0407	Proteína hipotética	Oxidasa de aminas de Cu
FOXG_17425***	0.0410	Proteína hipotética	Superfamilia de los facilitadores TRI12
FOXG_10045*	0.0413	Proteína hipotética	<i>No encontrado</i>
FOXG_09678	0.0415	Proteína hipotética	SRR1

La tabla representa los 30 genes con mayor grado de represión en los transformantes T2 y T3 entre los 710 genes reprimidos en ambas estirpes. Se han asociado por colores aquellos genes del grupo de 30 que se encuentran en la misma región genómica. Cada asterisco rojo (*) representa otro gen afectado por represión en la misma región genómica del gen señalado con el asterisco, pero que no figura en la lista de la tabla. Por ejemplo, *Foxg_02668*** se encuentra junto a otros dos genes reprimidos en su misma región. Se ha utilizado el símbolo >**** para el caso del gen *Foxg_15242*, ligado al menos a otros 10 genes reprimidos en una región de más de 40 kb de secuencia genómica.

SDR: Deshidrogenasa/Reductasa de cadena corta

MFS: Superfamilia de facilitadores principales

SRR1: Proteína reguladora de respuesta a estrés

RING: dominio tipo dedo de zinc

Dado que el silenciamiento afecta al gen *carS* (sexto gen en grado de represión en la tabla) y que éste ocurre de forma más acusada en el transformante T2 que en T3, los datos sugieren que esa es la causa del fenotipo de superproducción de carotenoides de ambas estirpes.

El análisis de RNA-Seq se limita a transcritos poliadenilados, por lo cual no aporta información respecto a la posible existencia de microARNs en la región intergénica anterior a *carS*, mencionada en el Capítulo 1. La existencia de dichos microARNs se basa en una predicción informática procedente de datos previos de otros microARNs en otros grupos taxonómicos. Con el objetivo de obtener información directa sobre la existencia de miARNs en *F. oxysporum*, se realizó un estudio de secuenciación masiva de ARNs de pequeño tamaño con las mismas muestras de ARN empleadas en este capítulo para el análisis de RNA-Seq de la estirpe silvestre incubada en oscuridad o expuesta una hora a la luz, así como en los mutantes *carS* SX1 y SX2 en oscuridad. Los datos fueron analizados en colaboración con el Dr. Tim Dahlmann (Universidad de Bochum, Alemania). Se muestra en la figura C2.10 A la visualización de transcritos de pequeño tamaño en la región intergénica entre los genes *Foxg_09306* y *carS*. Como se puede apreciar, no se encontraron indicios de existencia de microARN en la zona estudiada, encontrándose numerosos ejemplos de pequeños ARN, aunque en número no muy elevado, en el resto del genoma (datos obtenidos en colaboración con Javier Pardo Medina). En la figura C2.10 B, se muestran dos ejemplos de observación de pequeños transcritos visualizados en otros genes.

Por otra parte, la observación de la misma región intergénica en las diferentes condiciones y estirpes analizadas muestra la presencia de un transcrito de aproximadamente 1 kb (Figura C2.11), no detectado anteriormente en la anotación del genoma, y que solapa con la secuencia del supuesto microARN *fox-mir2* descrito en el Capítulo 1. Este transcrito es objeto de estudio en el Capítulo 3.

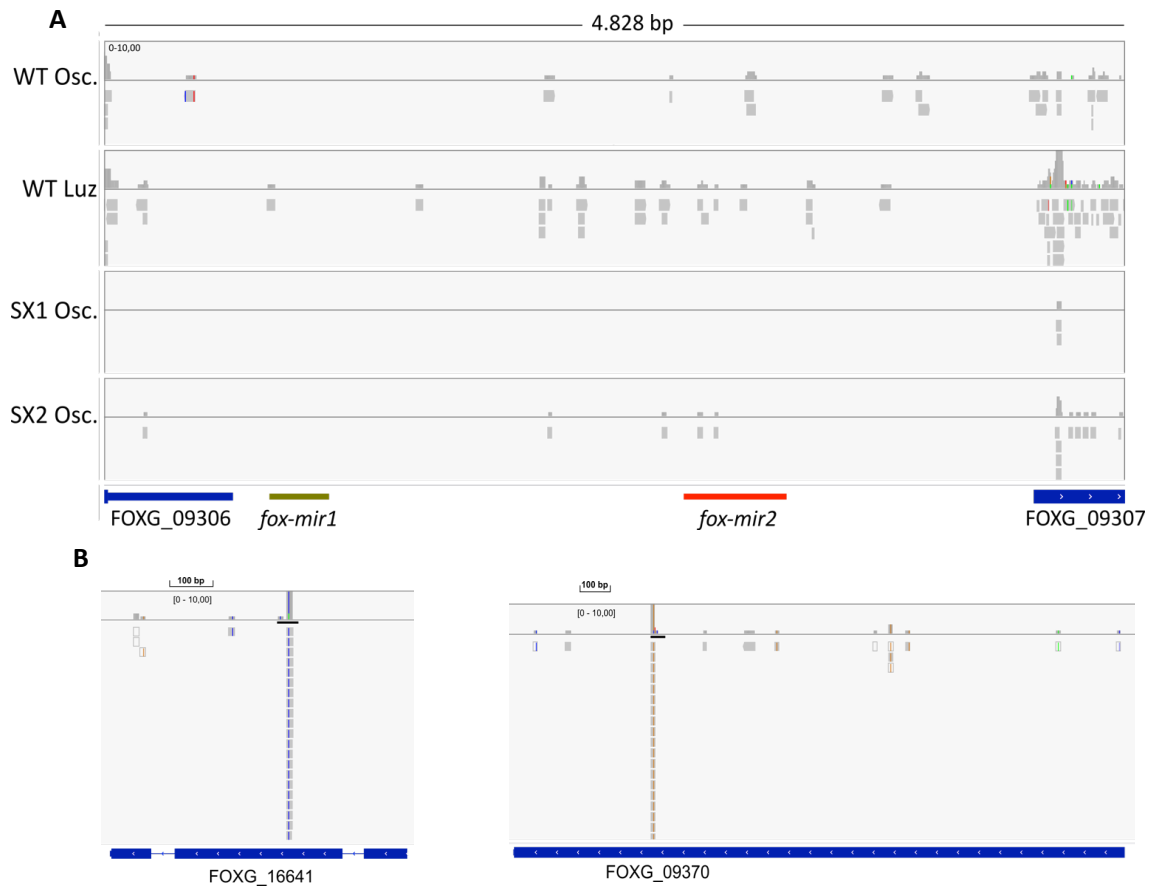


Figura C2.10. Lecturas de los transcritos obtenidos en el análisis de RNAseq de ARNs pequeños en la zona intergénica entre el gen *Foxg_09306* y el gen *carS* (*Foxg_09307*) en *F. oxysporum*. Las muestras representadas son de la estirpe silvestre (WT) en oscuridad o incubada una hora en luz, y los mutantes *carS* SX1 y SX2 en oscuridad. La línea verde indica la zona correspondiente a *fox-mir1* y la línea discontinua roja la zona que cubre *fox-mir2*. Los gráficos se representaron mediante el programa IGV.

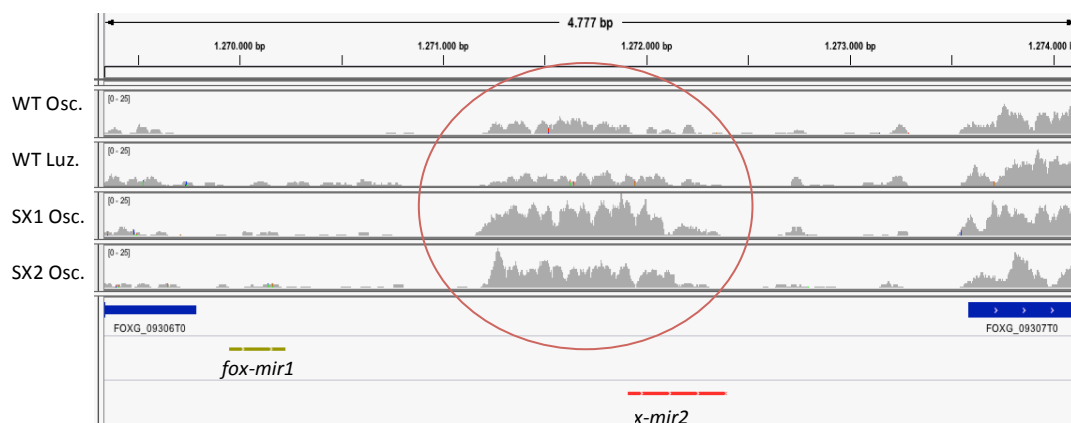


Figura C2.11. Representación mediante la plataforma IGV de las lecturas de los transcritos obtenidos en el análisis de RNAseq de la zona intergénica entre el gen *Foxg_09306* y el gen *carS* (*Foxg_09307*). Las muestras representadas son de la estirpe silvestre (WT) en oscuridad o incubada una hora en la luz, y los mutantes *carS* SX1 y SX2 en oscuridad. El círculo anaranjado muestra la existencia de un transcrito ausente en la anotación previa del genoma. Las líneas discontinuas verdes marcan la secuencia correspondiente al supuesto ARN precursor de *fox-mir1* y las líneas discontinuas rojas la del presunto precursor de *fox-mir2*.

Capítulo 3

Capítulo III. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *carP*

Introducción

Los estudios de secuenciación masiva han revelado que la mayor parte de los genomas de los eucariotas superiores se transcribe, a pesar de que contienen un porcentaje muy elevado de secuencias no codificantes. Por ejemplo, en el proyecto *ENCODE* se observó la transcripción de tres cuartas partes del genoma humano (Binery et al., 2007; Bernstein et al., 2012; Djebali et al., 2012) y un resultado parecido se obtuvo con el genoma del ratón (Carninci et al., 2005). Las nuevas regiones de transcritas pueden representar genes conocidos codificadores de proteínas, nuevos transcritos que codifican proteínas y transcritos que no parecen tener la capacidad de codificar proteínas (van Bakel et al., 2010). Como consecuencia se está descubriendo y anotando un número creciente de nuevas clases de ARNs no codificantes (ARNnc), que abarcan desde ARNs pequeños reguladores, como los ARN interferente, los microARNs y los ARNs asociados a Piwi, hasta segmentos más largos de ARN, que incluyen a los ARNs largos no codificantes (ARNlnc) y los ARNs largos no codificantes intergénicos (lincARNs) (Ponting et al., 2009; Ma et al., 2013). En particular, la tecnología ARN-Seq ha sacado a la luz cientos de ARNlncs en un amplio rango de organismos eucariotas, que van desde levaduras hasta humanos (Okazaki et al., 2002; Ravasi et al., 2006; Guttman et al., 2009; McKinlay et al., 2011). Los ARNlncs surgen como un grupo heterogéneo de transcritos no codificantes implicados en una gran variedad de procesos regulatorios en eucariontes. Inicialmente fueron descubiertos en humanos, aunque en la última década también se han identificado en hongos. Algunos ejemplos de ARNlncs de levaduras están bien caracterizados y descritos en la literatura, mientras que otros han sido recientemente identificados y necesitan ser investigados en más detalle (revisado por Till et al., 2018a). Los ARNlncs son muy diversos en cuanto a sus funciones, características y estrategias de regulación. Están involucrados en procesos celulares tales como el metabolismo y la respuesta a estrés, control del ciclo, celular o en silenciamiento de otros genes a través del control transcripcional y post-transcripcional de su expresión mediante interacciones ARN-proteína, ARN-ADN o ARN-ARN (Arthanari et al., 2014).

La característica principal de los ARNlncs es que poseen un tamaño superior a 200 pb. Los modelos estudiados en humanos, plantas, animales y hongos se dividen generalmente en 4 categorías (Figura 1):

- 1) ARNlnc sentido que solapa con uno o más exones del transcrito en la misma cadena.
- 2) ARNlnc antisentido que solapa con uno o varios exones en la cadena contraria.
- 3) ARNlnc intrónico, situado en el intrón de un gen.
- 4) ARNlnc intergénico, situado entre dos genes en la misma cadena (Quan et al., 2015).

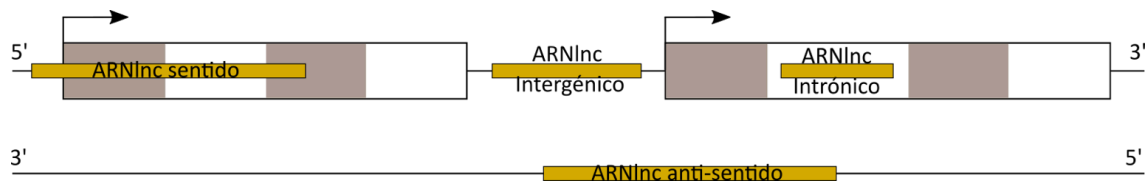


Figura 1. Clasificación de los ARNlncs. En gris se indican los exones y en blanco los intrones. La línea negra representa la cadena de ADN. Las cajas doradas representan los ARNlncs y las flechas indican la dirección de los transcritos. Modificado de Quan et al., 2015.

En los hongos filamentosos, hasta la fecha solo se ha descrito un ARNlnc en *Trichoderma reesei*, implicado en la regulación de expresión de celulasas (Till et al., 2018b). En el caso de *N. crassa* se han identificado unos 939 ARNlncs, de los cuales más de la mitad son antisentido de genes anotados (Arthanari et al., 2014) pero hasta ahora no se ha descrito la funcionalidad de ninguno de ellos. Sin embargo, en *Fusarium oxysporum* solo se han descrito, hasta el momento, ARNlnc procedentes de plantas y que son reconocidos por el hongo en el proceso de infección (Li et al., 2017; Zhu et al., 2014).

Como ya se ha descrito en el final del capítulo anterior, el análisis del transcriptoma de *F. oxysporum* reveló, en una región genómica próxima al gen *carS*, un transcrito no anotado en el genoma que presenta diferencias notables de expresión entre la estirpe silvestre y los mutantes *carS* SX1 y SX2. Se decidió estudiar más en detalle este transcrito debido a su proximidad al gen *carS* y a que parte de su secuencia genómica solapa con la región perteneciente al supuesto microARN, “*fox-mir2*”, descrito en el Capítulo 1. Los ARNlnc emergen como nuevos factores reguladores epigenéticos o transcripcionales en los distintos organismos eucariotas, sugiriendo la posibilidad de que este transcrito sea un ARNlnc con una conexión con el gen *carS*.

Resultados

Caracterización del transcrito del gen *carP*

Los datos de ARN-Seq obtenidos en el Capítulo 2 muestran un transcrito de aproximadamente 1,2 kb entre los genes *Foxg_09306* y *carS*. La base de datos del genoma de *Fusarium oxysporum*, disponible a través de los servidores web del Broad Institute y Ensembl Fungi, no muestra ninguna anotación correspondiente a dicho transcrito, supuestamente por la inexistencia de características identificables como un

gen codificante de proteína. Los resultados que se describen en las secciones siguientes llevaron a denominar a este transcrito *carP*, por su relación con la fotoinducción de la carotenogénesis. Al ser identificado con la metodología ARN-Seq, se deduce que *carP* es poliadenilado y, por tanto, que es transcrito por la ARN polimerasa II. A juzgar por la cantidad de lecturas (Figura C3.1), los niveles de los transcritos son más bien reducidos, pero su tamaño es aproximadamente el mismo en las distintas estirpes o condiciones de cultivo estudiadas. La observación de las lecturas no indica la presencia de ningún intrón en su secuencia.

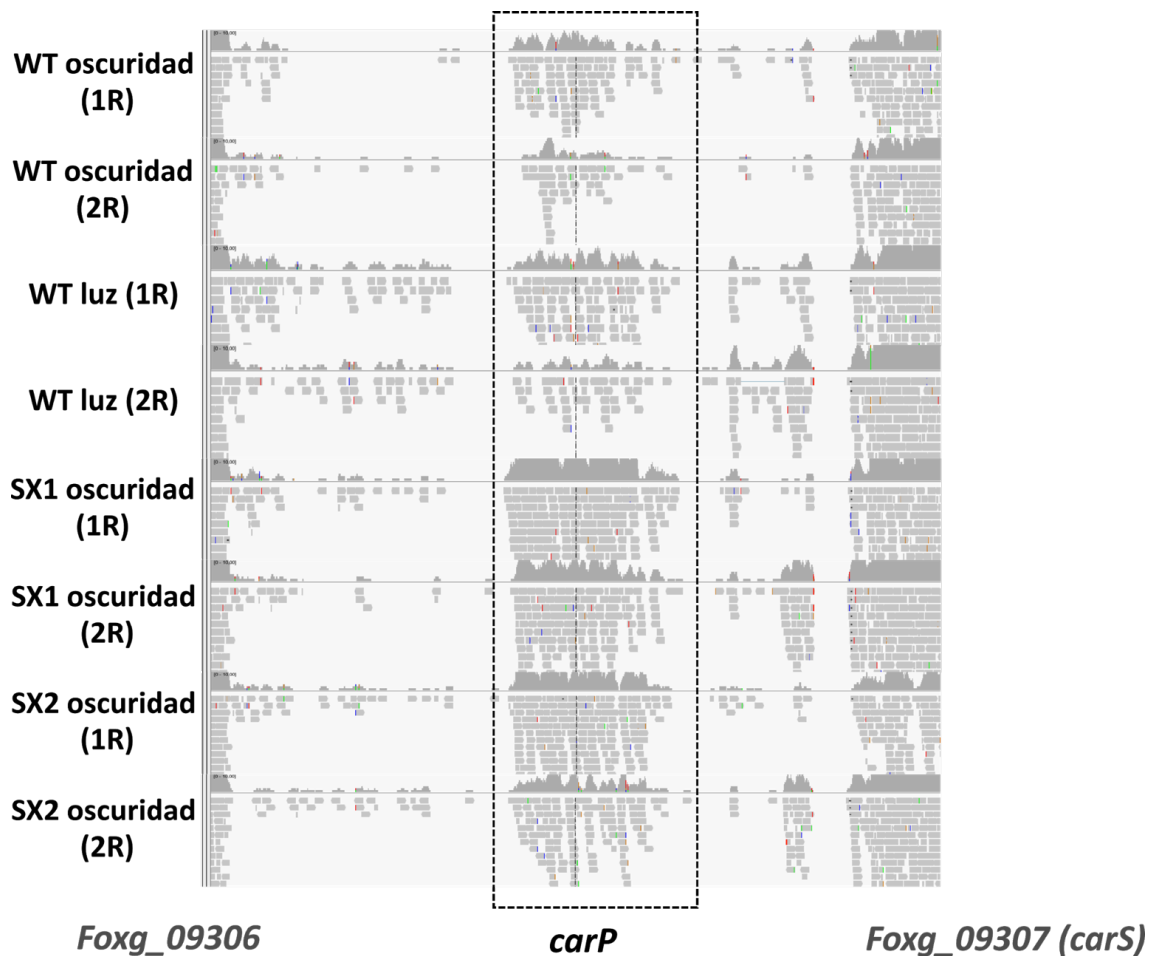


Figura C3.1. Lecturas de los transcritos de *carP* en el análisis de los datos de ARN-Seq. Análisis de la región genómica entre el gen *Foxg_09306* y *carS* (*Foxg_09307*) en la estirpe silvestre y los mutantes *carS* SX1 y SX2. Se muestran los resultados en luz y oscuridad para la estirpe silvestre y en oscuridad para los mutantes *carS*. En cada condición se muestran los perfiles obtenidos con las dos muestra biológicas analizadas (1R= Réplica 1; 2R= Réplica 2). Las lecturas se representaron mediante el programa IGV.

Orientación del gen *carP*

Las lecturas del ARN-Seq del Capítulo 2 no aportan información sobre la orientación de los transcritos. Por tanto, a fin de determinar la orientación del transcrito *carP* se utilizó una estrategia experimental basada en la retrotranscripción de la primera cadena de ADNc (ADN1c) con cebadores específicos de cadena y la posterior detección del mismo mediante PCR. Para ello se prepararon dos mezclas independientes de cebadores del gen *carP*, en un caso con 4 cebadores *forward* y en el otro caso con 4 cebadores *reverse* (Figura C3.2 A), usando como referencia de *forward* y *reverse* la orientación del gen *carS*. Se obtuvo ARN total del micelio de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* incubada en oscuridad, y se retrotranscribió la cadena del ARN *carP* usando por un lado la mezcla de cebadores *forward* y por otro la mezcla de cebadores *reverse* de dicho gen (procedimiento descrito en más detalle en Material y Métodos). Los cebadores *reverse* solo retrotranscribirán la cadena complementaria del ARN de *carP* si éste estuviera transcrito como *sense*, es decir, en el mismo sentido en el que se transcribe el gen *carS*. De la misma manera los cebadores *forward* solo retrotranscribirán al ARN de *carP* si éste tuviera la orientación *antisense*.

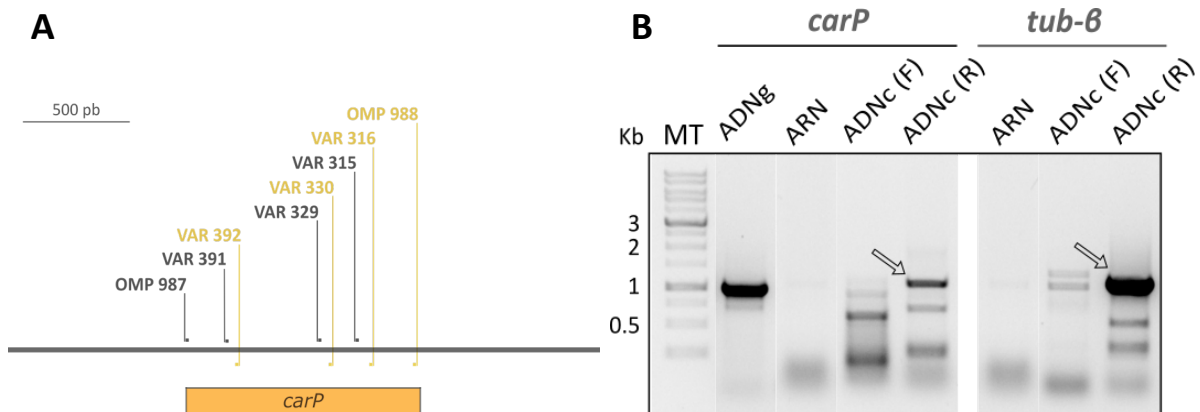


Figura C3.2. Determinación de la orientación del transcrito de *carP*. **A** Localización de los cebadores utilizados para determinar la orientación del transcrito de *carP* mediante PCR, utilizando como molde ADN1c obtenido de ARN total. Los cebadores indicados en gris tienen dirección *forward* y los cebadores indicados en dorado tienen dirección *reverse*. **B** PCR sobre ADN1c para determinar la orientación del transcrito *carP*. Identidad de los carriles: MT, marcador de tamaño; ADNg, PCR del transcrito de *carP* utilizando como molde ADN genómico de la estirpe silvestre incubada en la oscuridad (control positivo); ARN, PCR del transcrito de *carP* utilizando como molde ARN total (control negativo de PCR y control de contaminación de ADN en las muestras de ADN1c); ADNc (F), PCR del transcrito de *carP* utilizando como molde ADN1c obtenido de una retrotranscripción de ARN total con una mezcla de cebadores *forward* de *carP*; ADNc (R), PCR del transcrito de *carP* utilizando como molde ADN1c procedente de una retrotranscripción de ARN total con una mezcla de cebadores *reverse* de *carP*. Los tres carriles restantes corresponden a la PCR realizada para el gen de la tubulina- β (*tub-β*), con los moldes indicados: ARN, ADNc (F) y ADNc (R). El transcrito de *tub-β* se ha utilizado como control de orientación conocida de la transcripción. Los tamaños de los productos de PCR esperados son de 1.099 pb para *carP* y de 1.169 pb para *tub-β*. Los cebadores empleados se describen en Materiales y métodos. Todas las muestras, tanto de ADNg como de ARN total, proceden de la estirpe silvestre incubada 3 días en oscuridad.

Se espera que las reacciones de retrotranscripción solo proporcionen producto en uno de los casos, o con los cebadores *forward* o con los *reverse*. Para averiguar qué mezcla origina el producto, se usaron dichas retrotranscripciones como sustratos en reacciones de PCR utilizando la pareja de cebadores extremos Foxy-48F y Foxy-48-R. Como resultado, se obtuvo una banda de amplificación mucho más intensa con los moldes de ADN1c *reverse* (Figura C3.2 B), indicando que la orientación del transcrito corresponde al sentido en el que se transcribe el gen *carS*. Como control positivo de la orientación se utilizó el gen de la tubulina- β (*tub- β*), cuya orientación es *sense*.

Marcos abiertos de lecturas en el transcrito del gen *carP*.

Para considerar el posible papel codificante del gen *carP*, se han determinado sus marcos abiertos de lectura u *Open Reading Frames* (ORFs) en ambas cadenas mediante la herramienta ORFfinder (NCBI *Insights*), empleando como criterio un mínimo de 25 aminoácidos consecutivos. El resultado muestra 11 posibles marcos abiertos de lectura para este transcrito, de ellos 7 en dirección *forward* (Figura C3.3). Sus tamaños oscilan entre los 38 aminoácidos en el ORF más corto hasta 198 en el más largo. Las comparaciones de estas secuencias con las de las bases de datos de proteínas no identificaron secuencias o dominios conservados conocidos, como se esperaría si fueran ORFs accidentales. Este dato sugiere que el ARN de *carP* no codifica ninguna proteína y podría tener un papel como ARN regulador.

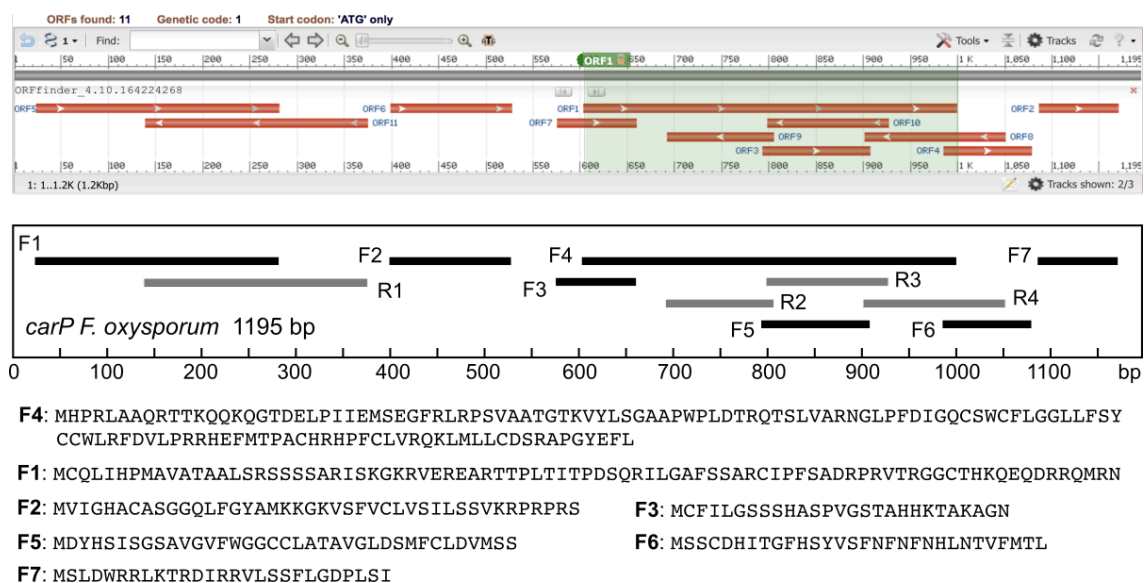


Figura C3.3. Marcos abiertos de lecturas (ORFs) en *carP*. En la parte superior de la imagen se representa la posición de cada una de los ORF existentes, mientras que en la parte inferior se representan los aminoácidos que componen cada posible ORF. Solo aparecen las secuencias de aminoácidos de los 7 marcos abiertos de lecturas de orientación *forward*, ya que es la orientación determinada experimentalmente. El análisis de los ORFs se realizó a través de la herramienta ORFfinder (NCBI).

Expresión del gen *carP*

Los resultados mostrados en el capítulo anterior sugieren un aumento de los niveles del transcrito *carP* en los mutantes *carS* (Figura C2.12). La secuencia de este transcrito está incluida en la región silenciada en los transformantes de inserción de ADN-T (T2 y T3), de forma más acusada en T2 que en T3 (Figura C2.9 A). Es interesante recordar que estos transformantes muestran una desregulación para la síntesis de carotenoides, con un fenotipo similar al de los mutantes *carS* en el caso de T2.

Para conocer la regulación del transcrito *carP*, se determinaron sus niveles en diferentes condiciones y estirpes mediante RT-qPCR. Se dispone de los datos de ARN-Seq como información previa de los niveles de *carP*, pero dichos datos se limitan al efecto de la luz en la estirpe silvestre, y a su presencia en los mutantes *carS* SX1 y SX2 y en los transformantes superproductores de carotenoides T2 y T3.

En el Capítulo 1 se describió el efecto de las mutaciones de *fox-mir1* y *fox-mir2* ($\Delta mir1$ y $\Delta mir2$, respectivamente) sobre los niveles de ARNm de los genes de la carotenogénesis (Figura C1.8). Este estudio se ha extendido al efecto de las deleciones sobre los niveles de *carP* en las mismas muestras, utilizando dos sitios diferentes en su secuencia, uno interno de la secuencia *fox-mir2*, solapante con *carP*, y otra secuencia dentro del transcrito *carP* que no solapa con *fox-mir2*. Con la excepción de la ausencia de la secuencia solapante con *fox-mir2* en los mutantes en los que se ha deleccionado, los resultados muestran niveles similares de transcrito con independencia de la región de *carP* que se analice (Figura C3.4), como cabe esperar de dos regiones de un mismo transcrito que comparten la misma vida media. Por tanto, nos referiremos a ellas globalmente como transcritos *carP*.

Los niveles de transcrito *carP* aumentan sensiblemente en la estirpe silvestre en la luz en relación con la oscuridad. Dicha fotoinducción es mucho menos patente en los mutantes *carS* y en los deleccionantes $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$ (con la lógica ausencia de datos en los mutante $\Delta mir2$ cuando se analiza la región de *carP* solapante con *fox-mir2*). Además, en los mutantes *carS* y en el deleccionante $\Delta mir1$, los niveles de *carP* en la oscuridad son mucho mayores que en la estirpe silvestre, mientras que en el deleccionante $\Delta mir2$ los niveles son inferiores. Llegados a este punto, la explicación molecular para el patrón opuesto de síntesis de carotenoides entre los mutantes *carS* y el deleccionante $\Delta mir2$ podría tener que ver con los patrones opuestos en los niveles de *carP*, pero no así para el deleccionante $\Delta mir1$, que muestra un fenotipo opuesto a *carS* mientras que sus niveles de *carP* son similares, o incluso mayores en $\Delta mir2$. En este sentido, también sorprende a primera vista el patrón opuesto de niveles de *carP* en los transformantes T2 y T3, cuando estas estirpes muestran menores niveles de *carP* que la estirpe silvestre, especialmente en la oscuridad, y por supuesto que los mutantes

carS. La interpretación de estos transformantes es, sin embargo, más compleja ya que como se describió anteriormente en el Capítulo 2, muestran una zona silenciada que incluye a la región del gen *carS*, lo cual puede explicar su fenotipo desregulado. Sin embargo, los niveles de *carP* aumentan en la luz en ambos transformantes, indicando que el silenciamiento sólo se produce en la oscuridad.

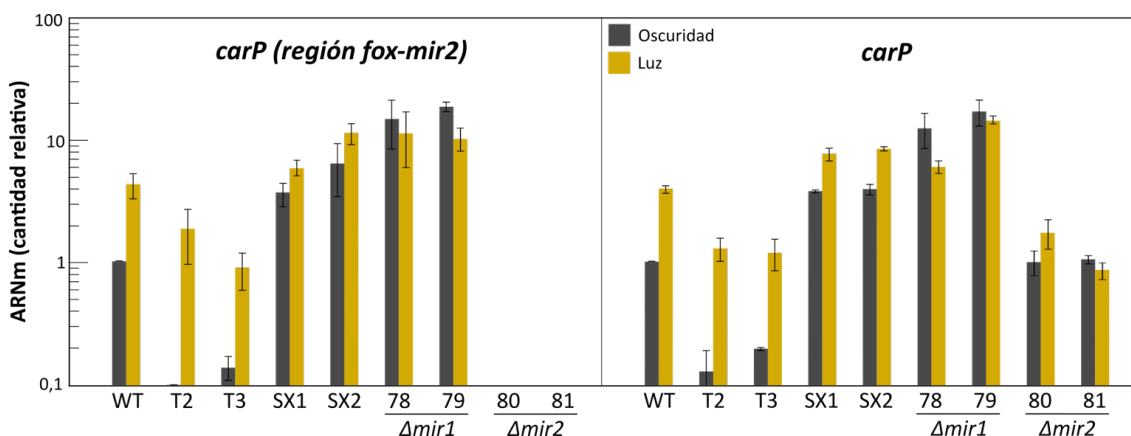


Figura C3.4. Niveles de ARN de *carP* en la estirpe silvestre, en las estirpes superproductoras de carotenoides y en los delecionantes $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$. Datos de RT-qPCR empleando cebadores para dos regiones distintas de *carP*, una de ellas correspondiente al supuesto precursor de microARN *fox-mir2*. Las estirpes se cultivaron en medio DGasn líquido durante 3 días en oscuridad y se expusieron posteriormente 1 hora a la luz. Los resultados muestran la media y error típico de tres experimentos independientes. Los niveles relativos de ARN están referidos al nivel de la estirpe silvestre en oscuridad.

Delección del gen *carP*

Para determinar la función del gen *carP* en *F. oxysporum*, se generaron estirpes mutantes en fondo silvestre mediante el reemplazamiento de su secuencia por un *cassette* de resistencia a higromicina. Para ello se construyó el vector pDul14, en el que se reemplazó el gen *carP* con el *cassette* Hyg^R mediante la técnica de recombinación homóloga en levaduras (ver Material y Métodos y Capítulo 1 de esta Tesis). Los cebadores empleados para esta construcción se describen en la Tabla M2 en Materiales y Métodos.

El vector pDul14 se utilizó para transformar protoplastos de la estirpe silvestre y tras seleccionar en medio con higromicina B se obtuvieron 5 transformantes. Tras purificar los transformantes 3 veces mediante selección de esporas uninucleadas para asegurar su homogeneidad genética, se analizaron 5 candidatos mediante PCR usando los cebadores Fox-ZI-LNC-F y Fox-ZD-LNC-R. Estos cebadores son externos a la región delecionada, y por tanto el tamaño del producto de PCR indica si se ha producido o no

el reemplazamiento. Solo uno de los 5 transformantes analizados mostró una banda de 4,4 kb, tamaño que corresponde al reemplazamiento de *carP* con el cassette *Hyg^R*, como se puede apreciar por la banda del mismo tamaño obtenida con el plásmido pDul14, utilizado en la transformación. De los otros 4 transformantes se obtuvo una banda de 4,2 kb, de mismo tamaño a la obtenida en la estirpe silvestre y que corresponde a la secuencia *carP* intacta (Figura C3.5 B). El único transformante $\Delta carP$ obtenido se denominó SX82.

Como verificación adicional, se llevó a cabo una hibridación de *Southern* de ADN genómico de la estirpe silvestre y del transformante SX82 utilizando una sonda exterior a la región delecionada, próxima al gen *carS* (Figura C3.5 A). Esta sonda, de 256 pb, se obtuvo a partir de ADN genómico de la estirpe silvestre con los cebadores Sonda-carP-1F y Sonda-carP-1R. Las muestras de ADN genómico se trataron con la enzima *AvaI*, para la cual hay una diana dentro del gen *carP*, pero no en el cassette *Hyg^R* (Figura C3.5 A), que se espera haya reemplazado a *carP* en SX82. De esta forma, se espera un patrón de bandas diferente entre la estirpe silvestre y la estirpe mutante. El resultado de la hibridación (Figura C3.5 C) muestra una banda de 3,3 kb en SX82, correspondiente a la presencia del cassette *Hyg^R* sin dianas *AvaI*, y una banda de 1,8 kb en la estirpe silvestre, que se espera por la presencia de la diana *AvaI* en *carP*.

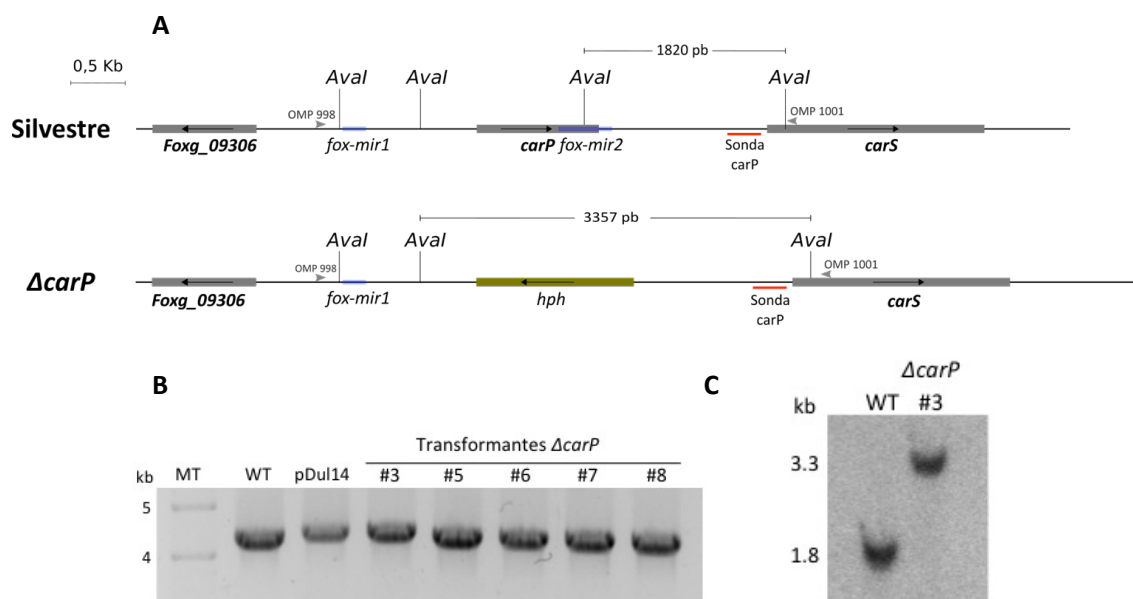


Figura C3.5. Delección del gen *carP* en la estirpe silvestre por reemplazamiento con un *cassette Hyg^R* (gen *hph*). **A** Estrategia de sustitución del gen *carP* por el *cassette Hyg^R* mediante recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. Se muestran los cebadores externos que se usaron para amplificar la región completa, la sonda de hibridación utilizada para la técnica de *Southern* y las dianas de la endonucleasa *Aval*. **B** PCR de comprobación de la delección del gen *carP* en los transformantes. Se empleó ADN genómico de la estirpe silvestre (WT) como control negativo, ADN de pDul14 (plásmido que contiene la construcción completa) como control positivo y ADN genómico de los transformantes. Los cebadores utilizados fueron Fox-ZI-LNC-F (OMP 998) y Fox-ZD-LNC-R (OMP 1001), que amplifican 4,2 kb del ADN genómico silvestre y 4,4 kb de pDUL14. MT: marcadores de tamaño. **C** Análisis *Southern* del ADN genómico de la estirpe silvestre y el transformante SX82 (#3 en el panel B) digeridos con la enzima de restricción *Aval* y usando la sonda indicada en el panel A. Los tamaños corresponden a 1,8 kb para la estirpe silvestre y 3,3 kb para el transformante con el reemplazamiento génico.

Caracterización del mutante del gen *carP*.

Pigmentación y contenido en carotenoides

El mutante *ΔcarP* SX82 presentó un fenotipo albino (Figura C3.6 A) en condiciones de iluminación, consistente con un defecto en la producción de carotenoides, mientras que en oscuridad presentó el mismo fenotipo que la estirpe silvestre. Dicho fenotipo de SX82 es el mismo que el mostrado por los mutantes *Δmir2* analizados en el Capítulo 1. Para confirmarlo, se analizó el contenido en carotenoides de SX82 y se comparó con el de los mutantes *Δmir2*. Como resultado se observó el mismo patrón de carotenoides, con sólo trazas en la oscuridad y una cantidad similarmente baja en la luz (Figura C3.6 B). Dado que la estirpe con la delección completa de *carP* muestra el mismo fenotipo que las dos estirpes *Δmir2*, con una

deleción parcial de *carP*, se sospecha que en ambos casos se ha producido la pérdida de función del gen *carP*. Para confirmarlo, se compararon los niveles de ARNm de distintos genes en las tres estirpes en comparación con la estirpe silvestre.

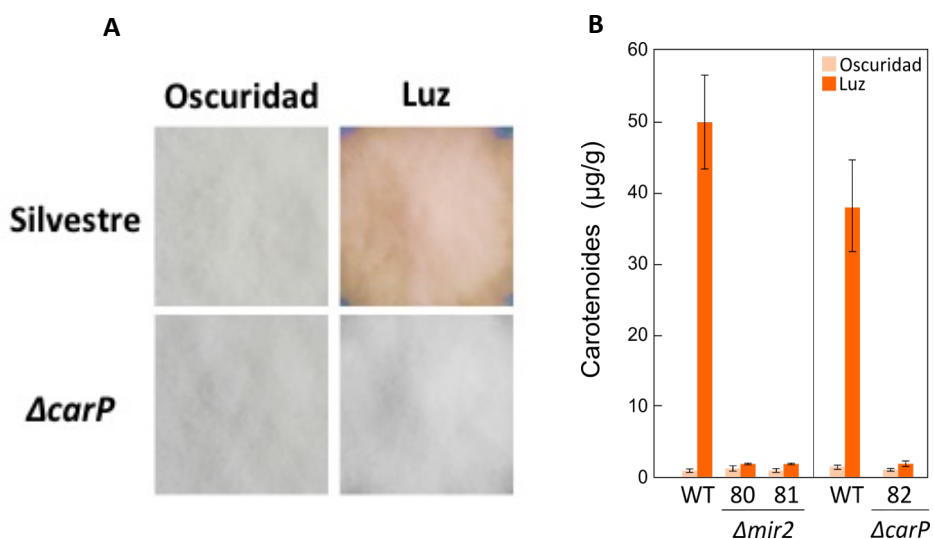


Figura C3.6. Caracterización fenotípica del mutante *carP* SX82. Se analizaron dos estirpes independientes de los mutantes $\Delta mir2$ (SX80 y SX81), la estirpe mutante $\Delta carP$ (SX82) y la estirpe silvestre (WT). Las condiciones de cultivo fueron 7 días de crecimiento en oscuridad o bajo iluminación constante en medio mínimo DGasn. **A** Aspecto de las colonias incubadas en oscuridad o en luz. **B** Contenido de carotenoides de las estirpes incubadas en oscuridad o en luz.

Niveles de ARNm de los genes *car* en los mutantes del gen *carP*

Para averiguar si la bajada de producción de los carotenoides en SX82 se debe a un descenso en los niveles de ARNm de los genes estructurales de la ruta de carotenogénesis, como ya se observó para los mutantes $\Delta mir2$ (Capítulo 1), se determinaron dichos niveles para los genes *carRA* y *carB* mediante RT-qPCR en el mutante SX82 y se compararon con los previamente obtenidos para los transformantes $\Delta mir2$. Para ello se incubaron la estirpe silvestre y el transformante SX82 durante tres días en medio mínimo DGasn en oscuridad y se expusieron a continuación una hora a la luz. Además de los dos genes estructurales, se incluyó en el estudio el gen *carS* (Figura C3.7).

El resultado mostró un fuerte descenso en los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* en el mutante SX82 en comparación con la estirpe silvestre. Dicho descenso fue similar al mostrado por los transformantes $\Delta mir2$, aunque en este caso el descenso para *carB* en la luz fue algo más acusado en SX82. De la misma forma, al igual que se observó para las estirpes $\Delta mir2$, el transformante SX82 mostró un aumento apreciable en los niveles de ARNm del gen *carS*, tanto en la luz como en la oscuridad.

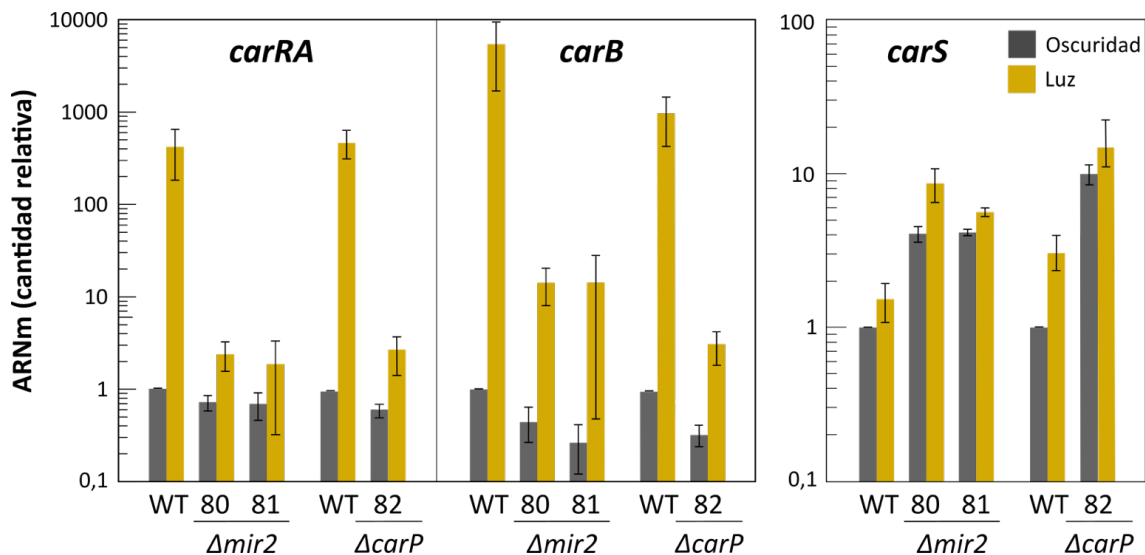


Figura C3.7. Efecto de la delección parcial y completa de *carP* sobre la expresión de los principales genes *car* estructurales, *carB* y *carRA* y el gen regulador *carS*. Las estirpes silvestre (WT), el mutante $\Delta carP$ y dos mutantes independientes de $\Delta mir2$, SX80 y SX81 se incubaron tres días bajo condiciones de oscuridad y una hora de exposición a luz. El análisis de expresión se realizó mediante RT-qPCR. Los resultados muestran la media y el error típico de 3 experimentos independientes.

Niveles de ARNm de los genes de fotorreceptores en los mutantes del gen *carP*

Como ya se ha mencionado en la introducción general, la luz estimula la biosíntesis de carotenoides en *F. oxysporum* a través de la activación transcripcional de los genes estructurales *carRA*, *carB* y *carT*. De acuerdo con estudios realizados en *F. fujikuroi*, la respuesta es mediada sobre todo por el fotorreceptor WcoA, llamado *wc1* en *F. oxysporum* (Ruiz-Roldán et al., 2008), con la participación accesoria de los fotorreceptores CryD y VvdA (Avalos et al., 2017). Además, el análisis transcriptómico descrito en el Capítulo 2 mostró que son numerosos los genes cuya expresión es estimulada por la luz. Por tanto, dado que la delección de *carP* reduce de forma muy patente la fotoinducción de los genes de la carotenogénesis, se decidió investigar si ello se debe a una alteración en la expresión de los genes de los fotorreceptores implicados en la respuesta. Por ello, se determinaron mediante RT-qPCR los niveles de ARNm de los genes ortólogos a *wcoA* (*wc1*, *Foxg_03727*), *cryD* (*Foxg_03570*) y *vvdA*

(*Foxg_03254*) en el transformante $\Delta carP$ SX82 en comparación con la estirpe silvestre (Figura C3.8). Los resultados mostraron el mismo patrón de expresión de *wcoA/wc1* en la estirpe silvestre y en SX82, por lo que se puede concluir que la fuerte disminución de los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* en el mutante $\Delta carP$ no se deben a una menor expresión de *wcoA/wco1*.

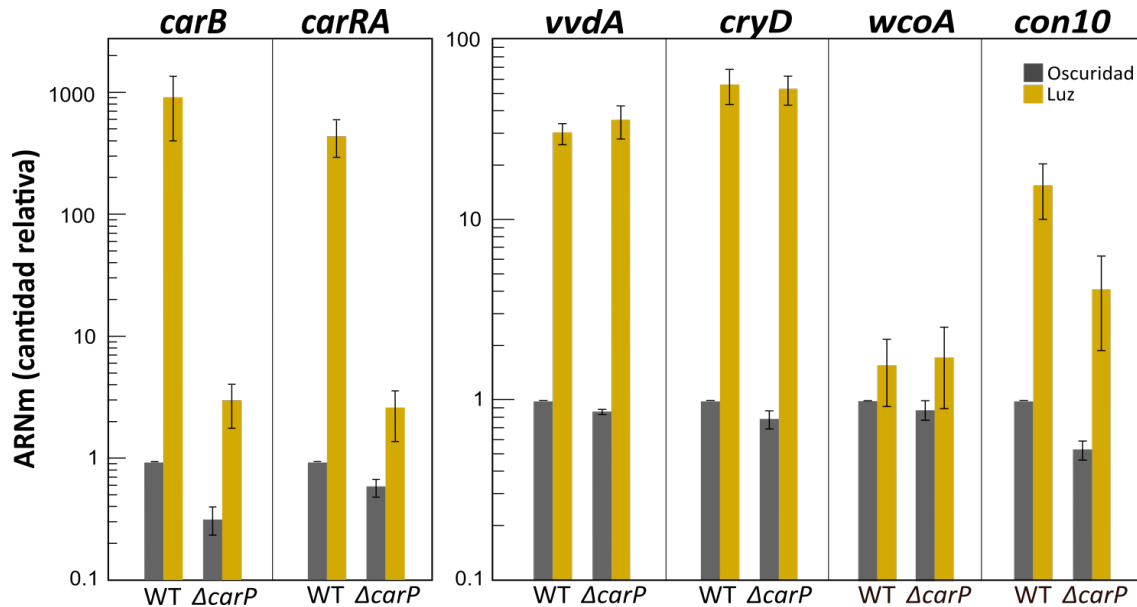


Figura C3.8. Efecto de la delección de *carP* sobre la expresión de los genes estructurales *carB* y *carRA*, los genes de fotorreceptores *vvdA*, *cryD* y *wcoA* (*wco1*) y el gen fotoinducible *con10*. Las muestras de ARN se obtuvieron a partir de micelio de silvestre (WT) y $\Delta carP$ cultivados tres días en oscuridad y una hora de exposición a luz. Los resultados muestran la media y el error típico de 3 experimentos independientes.

Como ya se observó en *F. fujikuroi*, y como indican los experimentos de transcriptómica (Capítulo 2), los niveles de transcritos de los genes *cryD* y *vvdA* aumentan fuertemente tras la exposición a la luz. Al igual que se ha observado para *wcoA*, los resultados mostraron que la mutación *carP* no afecta a los niveles de transcritos de estos genes. Llama la atención que, al contrario que *carRA* y *carB*, los genes *cryD* y *vvdA* mantuvieron el mismo patrón de fotoinducción con independencia de la presencia o ausencia de *carP*. El mismo resultado se obtuvo para el gen *Foxg_01269*, ortólogo de *con-10* de *N. crassa*, elegido como ejemplo de gen fotoinducible no relacionado con la carotenogénesis. Este resultado indica que el ARN *carP* no es un regulador maestro de los genes fotoinducibles en *F. oxysporum*, sino que ejerce su función de forma más específica sobre un cierto juego de genes, entre los que se encuentran al menos los genes estructurales de la carotenogénesis.

Capítulo 4

Capítulo IV. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *carF*

Introducción

Los resultados descritos en los capítulos anteriores muestran la existencia de una región regulatoria aguas arriba del gen *carS*, que incluye un gen para un ARN no codificante. Al lado del gen *carP*, a unos 4 kb de *carS*, se encuentran los genes *Foxg_09306*, *Foxg_09305* y *Foxg_09304*. El gen *Foxg_09306*, al que ya se prestó atención en el del Capítulo 2 (página 96), codifica supuestamente una proteína de 142 aa cuya secuencia carece de dominios conocidos o predecibles. El desconocimiento completo sobre las posibles funciones de proteínas predichas a partir del genoma de *F. oxysporum* es bastante común, ya que un 22% de las proteínas anotadas en su genoma (según los datos analizados en el ARN-Seq realizado en este trabajo) carecen de precedentes funcionales o de dominios proteicos conocidos. Con respecto al gen *Foxg_09305*, determina una proteína de 386 aa que contiene un posible dominio INSIG, que se ha asociado a la regulación de la biosíntesis de esteroides en animales y en algunos microorganismos (Flury et al., 2005). Por su parte, *Foxg_09304* codifica una proteína de 491 aa con varias repeticiones del dominio proteico WD40, muy extendido en eucariotas e involucrado en interacciones para formar complejos proteicos (Smith, 2008). Las proteínas que contienen repeticiones de este dominio están implicadas en un amplio rango de funciones, tales como la transducción de señales, la regulación del ciclo celular o la regulación de la transcripción (Li y Roberts, 2001).

Los genes *Fox_09306*, *Fox_09305* y *Foxg_09304* se investigaron en un trabajo anterior en el mismo grupo, sin embargo, no reveló ningún posible papel en la regulación de la carotenogénesis. Estos trabajos se limitaron a una observación visual de los mutantes generados y no se llegaron a realizar análisis bioquímicos de los contenidos de carotenoides (Rodríguez-Ortíz, 2012). No obstante, en el estudio de las causas moleculares de los fenotipos desregulados de los transformantes T2 y T3, se observó que ambas estirpes coinciden en la presencia de alteraciones en la región intergénica entre el gen *carS* y *Foxg_09306* generadas en el proceso de transformación con *A. tumefaciens*. Esta región debe incluir la secuencia promotora de *Foxg_09306*. Los datos mostraron también que T2 presenta un aumento considerable en la expresión de *Foxg_09306* (Figura C2.9 C, Capítulo 2). Además, uno de los supuestos genes de precursores de microARN, *fox-mir1*, se ubica en esta región intergénica, cerca de donde se espera que se encuentre el promotor de este gen. La delección de *fox-mir1* provocó una bajada de los niveles de ARNm de los genes de la carotenogénesis y una fuerte reducción de la acumulación de carotenoides con respecto a la estirpe silvestre. Esta respuesta es opuesta a la provocada por la alteración genómica de T2, que provocaba sobreexpresión de estos genes en oscuridad y un fuerte aumento en la síntesis de carotenoides independiente de la luz (Capítulo 1).

Los genes *carS* y *carP* constituyen elementos reguladores de especial relevancia en el control de la carotenogénesis en *Fusarium*. La cercanía de la secuencia *fox-mir1* al promotor del gen *Foxg_09306* y la sobreexpresión de este gen en el transformante T2 sugiere un posible papel regulador para *Foxg_09306*. El objetivo de este capítulo es investigar la función de este gen, que denominaremos a partir de ahora *carF*.

Resultados

Caracterización del gen *carF* (*Foxg_09306*) de *Fusarium oxysporum*

Según el genoma anotado de *F. oxysporum*, el gen *carF* se transcribe en dirección opuesta a la de los genes *carP* y *carS*, y codifica una proteína no caracterizada de 142 aminoácidos, carente de dominios conservados. Al contrastar su secuencia con un análisis BLASTP específico de secuencias de proteínas a través de la plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) se detecta similitud con su ortólogo en otras especies de *Fusarium*, tales como *F. fujikuroi*, *F. graminearum* o *F. verticillioides*, con una identidad superior al 90%. Sólo se encontró un dominio conservado en una de las proteínas homólogas en *Fusarium nygamai*, un patógeno de leguminosas, en la que la secuencia de la proteína codificada por el gen ortólogo a *Foxg_09306*, *Fnyg_04818*, posee un dominio conservado perteneciente a la proteína UL16, de la familia *HerpesVirus*. Esta proteína juega un papel en la maduración de la cápsida de estos virus y en el empaquetamiento del ADN (NCBI, código de acceso cl28066). Salvo esta información, irrelevante en el contexto de este capítulo, no se encontró nada más en las bases de datos.

Según el servidor web *Innovagen* (*Peptide, property calculator*), que calcula las propiedades de los péptidos, la proteína CarF tiene un peso molecular esperado de 15,6 KDa. Las predicciones apuntan a una proteína muy soluble en agua (hidrofílica), que se espera que deje de ser soluble a pH inferior a 5. El análisis a través del servidor *CCTOP* (*Constrained Consensus TOPology prediction server*) indica que no posee dominios transmembrana, mientras que el análisis *STRING* (*Search Tools for Recurring Instances of Neighbouring Genes*) no anticipa ninguna interacción conocida con otras estructuras moleculares. Según varias bases de datos contrastadas (CDD NCBI; Prosite, ExPASy; InterPro, EMBL-EBI), tampoco parece tener dominios conservados conocidos, homología con familias de proteínas o estar relacionado con procesos celulares según las clasificaciones del *Gene Ontology* (GO). Por tanto, el análisis informático de la secuencia de 142 aminoácidos de CarF apenas aporta ninguna pista sobre su posible función.

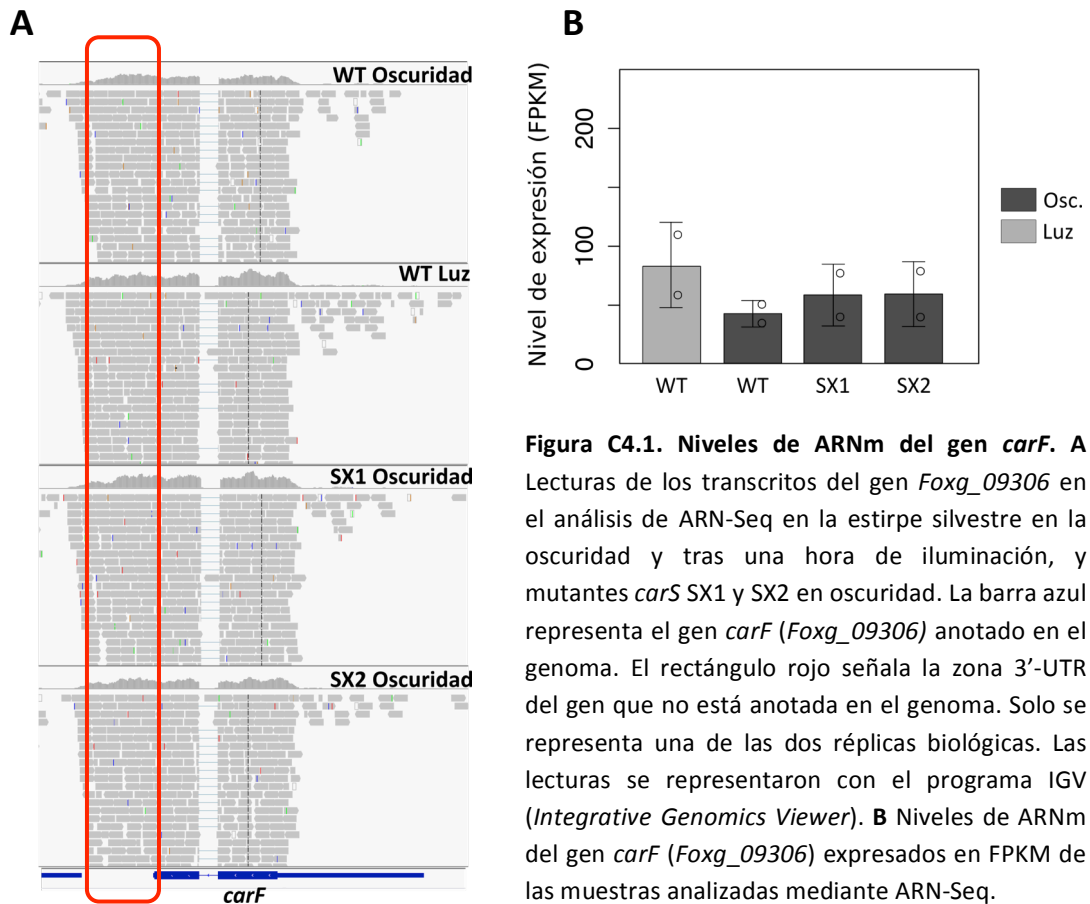
Los datos de ARN-Seq de este gen muestran un tamaño de transcrito más largo que el que corresponde al gen originalmente anotado (*Foxg_09306*), ya que se extiende unas 300 bases más allá del codón de parada (Figura C4.1, rectángulo rojizo). La región no parece tener ninguna región codificante significativa a partir del codón de parada, por lo que podemos concluir que se trata de una región 3' UTR larga.

Otra observación destacable de las lecturas de los transcritos es que en todas las muestras aparecen algunas lecturas en la zona anotada como 5' UTR, pudiendo indicar un sitio alternativo de inicio de la transcripción (Figura C4.1 A).

Expresión del gen *carF*

Los datos de transcriptómica descritos en el Capítulo 2 aportan ya información sobre la expresión del gen *Foxg_09306*, en particular sobre el efecto de la luz y de la mutación del gen *carS*. Los resultados muestran en la estirpe silvestre más lecturas para el gen *carF* tras una hora de iluminación que en la oscuridad, mientras que en los mutantes *carS* la cantidad de lecturas en oscuridad es más similar a la de la estirpe silvestre en oscuridad que a la expuesta a la luz (Figura C4.1 B). La ausencia de efecto de la mutación *carS* contrasta con el fuerte incremento en los niveles de transcrito de este gen en el transformante T2 (Figura C2.9, Capítulo 2). Esta estirpe posee una alteración en la secuencia de ADN cercana al promotor de *carF*, por lo que puede que esté influyendo en su transcripción. Por el contrario, no se aprecian cambios de expresión del ARNm de este gen en los mutantes *carS*, SX1 y SX2 (Figura C4.1 B).

Para confirmar los resultados obtenidos en el análisis de ARN-Seq, se hicieron nuevas incubaciones para analizar los niveles de ARNm del gen *Foxg_09306* mediante RT-qPCR en la estirpe silvestre y en los mutantes *carS*, tanto en condiciones de oscuridad como tras una hora de iluminación (Figura C4.2). Ese análisis es más completo que el de ARN-Seq, ya que, por limitaciones en la cantidad de muestras, en ese estudio solo se analizó el efecto de la luz en la estirpe silvestre. Los resultados muestran que los niveles de ARNm del gen *carF* son varias veces mayores en la luz que en la oscuridad en la estirpe silvestre, en los mutantes *carS* y en los transformantes T2 y T3. Los niveles de transcrito fueron sin embargo mayores en el transformante T2, corroborando datos previos de ARN-Seq, pero no en el transformante T3 en oscuridad.



Teniendo en cuenta que los niveles de ARNm del gen *carF* aumentan considerablemente en el transformante T2, posiblemente a causa de la alteración en la región de ADN próxima a su promotor, se decidió averiguar si las deleciones en las secuencias *fox-mir1* y *fox-mir2* ($\Delta mir1$ y $\Delta mir2$, Capítulo 1) afectan a los niveles de transcrito de *carF*, para lo cual se realizaron nuevas incubaciones en las mismas condiciones de cultivo. Aunque inicialmente se contemplaron como posibles secuencias precursoras de microARNs, en los Capítulos 2 y 3 se descartó esta hipótesis y se determinó la relación de estas secuencias con el ARNinc *carP*, por lo cual se incluyó también el mutante $\Delta carP$ SX82 en este estudio. Los resultados confirmaron el incremento en el nivel de ARNm *carF* en la luz en relación a la oscuridad en la estirpe silvestre, pero tal fotoinducción parece ser menos evidente en los mutantes $\Delta mir1$ y $\Delta mir2$ y en el mutante $\Delta carP$. Un resultado inesperado es que los niveles de ARNm de *carF* aumentaron fuertemente en los mutantes $\Delta mir1$ y $\Delta carP$, pero no en el mutante $\Delta mir2$. Una explicación plausible es que en los mutantes $\Delta mir1$ y $\Delta carP$ se han perdido elementos reguladores negativos del promotor de *carF*, ya que la secuencia *fox-mir1* se encuentra próxima a dicho promotor, y ésta no se encuentra muy lejos del borde de la secuencia delecionada en el mutante $\Delta carP$. En cambio, la secuencia *fox-mir2* se ubica mucho más lejos.

La caída en los niveles de transcritos de los genes estructurales de la carotenogénesis en los mutantes $\Delta mir1$ y $\Delta carP$, y la subida en la cantidad de ARNm *carF* en dichos mutantes podrían ser independientes o podrían tener alguna relación regulatoria. Este hecho, unido a que el propio gen *carF* es fotoinducible, llevó a estudiar la función del gen *carF* mediante su delección dirigida.

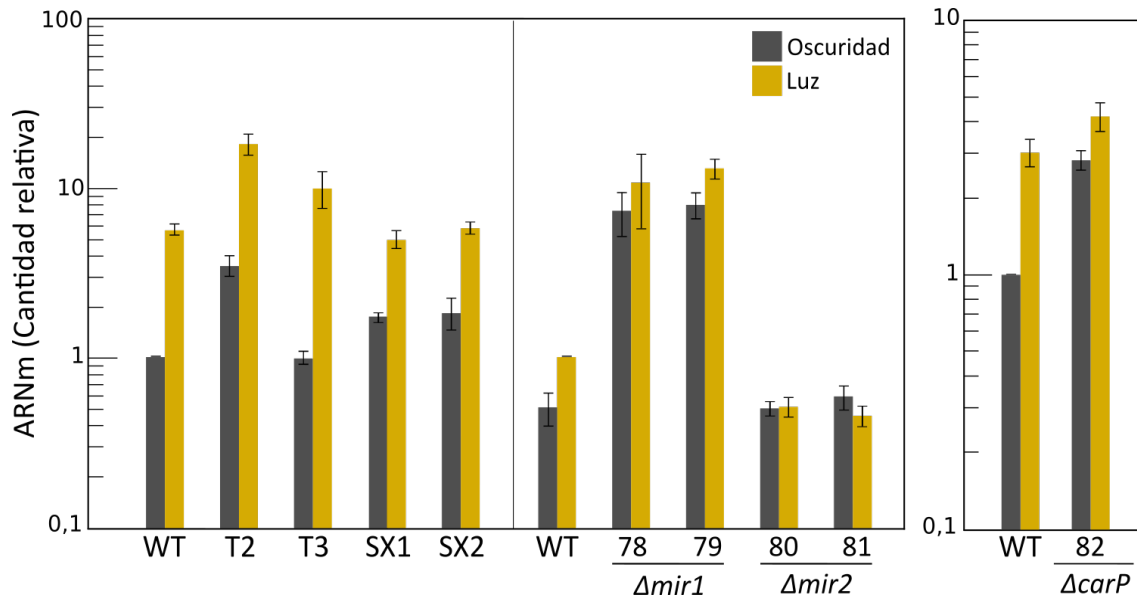


Figura C4.2. Niveles de ARNm del gen *Foxg_09306* en distintas estirpes y condiciones. Las muestras se obtuvieron a partir de cultivos de tres días en medio mínimo DGasn en oscuridad, que se expusieron en su caso una hora a la luz. Los resultados muestran la media y el error estándar de tres réplicas biológicas independientes. Los mutantes SX 78, SX79, SX80, SX81 y SX82 se abrevian con sus correspondientes números.

Delección del gen *carF*

Para estudiar la función del gen *carF* en *F. oxysporum* se generaron estirpes mutantes en fondo silvestre mediante reemplazamiento génico. Para ello se construyó un plásmido mediante la técnica de recombinación homóloga en levaduras (ver Material y Métodos), con fragmentos de la región promotora y terminadora del gen *carF* flanqueando al marcador de resistencia a higromicina *hph*. Los cebadores utilizados para hacer esta construcción se muestran en la tabla M2 en Materiales y Métodos. El plásmido obtenido, que se denominó pDul15, se utilizó para transformar protoplastos de la estirpe silvestre. Como ya se llevó a cabo con las mutaciones dirigidas de otros genes o secuencias (Capítulos 1 y 3), el objetivo es reemplazar el ORF de *carF* por el *cassette* de resistencia a higromicina Hyg^R (Figura C4.3 A). Como resultado se obtuvieron 4 transformantes, que se pasaron por esporas uninucleadas 3

veces para asegurar su homocariosis y finalmente se caracterizaron molecularmente mediante PCR e hibridación por *Southern*.

Se seleccionaron cuatro transformantes para un escrutinio previo por PCR, usando los cebadores externos Fox-ZI_FOXG_09306-F y Fox-ZD-FOXG_09306-R. Dos de ellos (transformantes #4 y #5) presentaron el patrón esperado para la delección del gen *carF*, consistente en un producto de amplificación de 4,7 kb frente al tamaño de 4 kb esperado para la secuencia *carF* silvestre. Los otros dos transformantes presentaron un patrón de bandas diferente, o similar al de la estirpe silvestre (Figura C4.3 B).

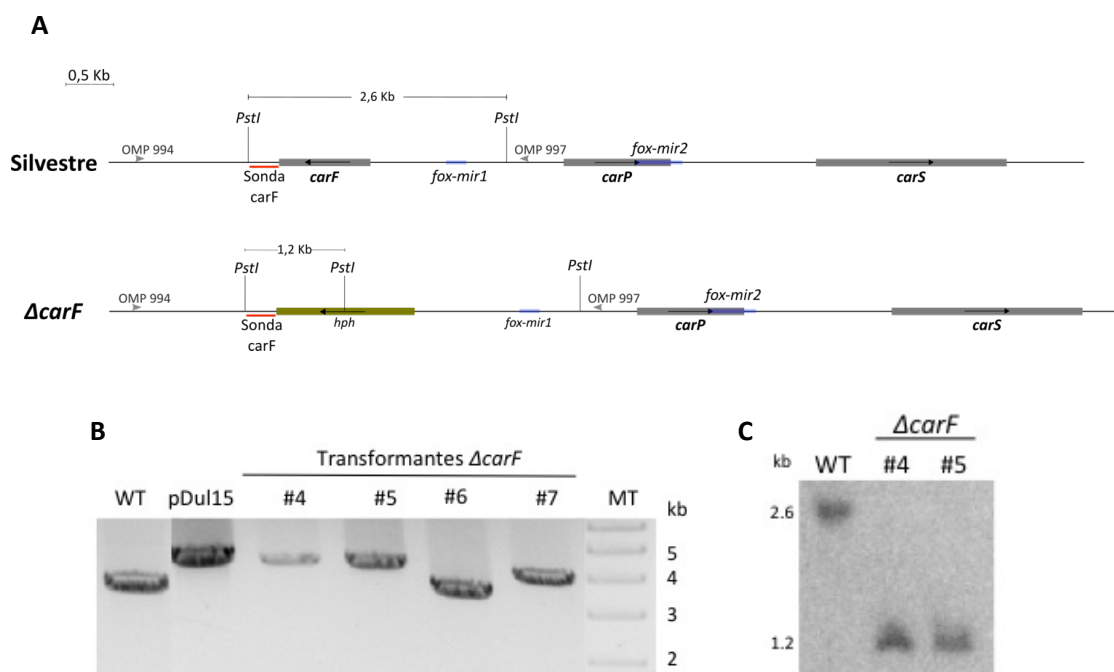


Figura C4.3. Delección del gen *carF* en la estirpe silvestre por reemplazamiento con un cassette Hyg^R (gen *hph*). **A** Mapas de la región genómica del gen *carF* en la estirpe silvestre y en los transformantes $\Delta carF$. En la transformación el gen *carF* es reemplazado mediante recombinación homóloga por un marcador seleccionable Hyg^R (*hph*). Se muestran los cebadores externos que se usaron para amplificar la región completa, la sonda utilizada para la hibridación de *Southern*, y las dianas de la endonucleasa *PstI*. **B** PCR de comprobación del reemplazamiento del gen *carF* en los transformantes. Se usó ADN_g de la estirpe silvestre (WT) como control negativo y el plásmido pDul15 usado en la transformación como control positivo. Los cebadores utilizados fueron Sonda-OMP 994 y OMP 997, que amplifican 4 kb en la estirpe silvestre frente a 4,7 kb en los transformantes con la región de *carF* reemplazada. MT: marcador de tamaño. **C** Análisis en *Southern* de ADN_g de la estirpe silvestre y los transformantes positivos en el ensayo de PCR (#4 y #5) tratado con la enzima de restricción *PstI* e hibridados con la sonda indicada en el esquema superior (A). Los tamaños de las bandas son 2,6 kb en la estirpe silvestre y 1,2 kb en los transformantes con el reemplazamiento correcto.

Posteriormente se verificó el correcto reemplazamiento de la secuencia silvestre y la ausencia de recombinaciones ectópicas adicionales en los transformantes #4 y #5 mediante análisis en *Southern*. Los ADN genómicos de la estirpe silvestre (WT) y de los transformantes $\Delta carF$ (#4 y #5) se trataron con la enzima de restricción *Pst*I, se separaron en electroforesis de agarosa y se transfirieron a una membrana. La hibridación se realizó con una sonda de 250 pb correspondiente a la región terminadora de *carF* (señalada con una línea roja, Figura C4.3 A), obtenida a partir de ADN de la estirpe silvestre con los cebadores Sonda-Foxg-1F y Sonda-Foxg-1R. La presencia de la secuencia de la sonda tanto en el *cassette* de delección en el plásmido como en el ADN genómico permite obtener bandas de tamaño diferente en la estirpe silvestre y en los transformantes con la delección. Como resultado, los transformantes analizados presentaron una banda de 1,2 kb correspondiente a la presencia del *cassette* de resistencia Hyg^R en lugar del gen *carF*, frente a la banda de 2,6 kb correspondiente a la secuencia silvestre del gen *carF* (Figura C4.3 C). La diferencia de tamaño se debe a la presencia de una diana *Pst*I en el gen *hph*, y a su ausencia en el gen *carF*. Los mutantes se denominaron SX83 ($\Delta carF$ #4) y SX84 ($\Delta carF$ #5).

Fenotipo de los transformantes $\Delta carF$

Pigmentación y síntesis de carotenoides

Las colonias en agar de los mutantes $\Delta carF$ mostraron una morfología y una capacidad de crecimiento muy similar a los de la estirpe silvestre. Sin embargo, mientras que en la oscuridad presentaron el característico aspecto albino silvestre, cuando se incubaron bajo iluminación su color fue mucho más pálido que la típica pigmentación anaranjada de la estirpe silvestre (Figura C4.4 A). Este fenotipo indica una menor capacidad de síntesis de carotenoides en respuesta a la luz, que se confirmó con los correspondientes análisis bioquímicos de su contenido en carotenoides. Los datos mostraron niveles silvestres en oscuridad, pero una reducción de un 60% en el contenido de carotenoides respecto a la estirpe control en la luz (Figura C4.4 B). Este resultado sugiere que *carF* desempeña una función reguladora en la carotenogénesis de *F. oxysporum*.

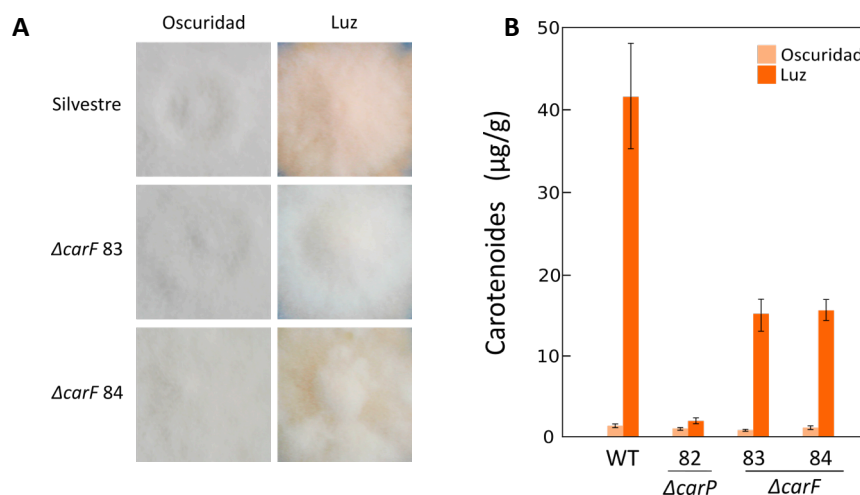


Figura C4.4. Caracterización fenotípica de los mutantes *carF*. La estirpe silvestre y los mutantes *carF* SX83 y SX84 se cultivaron 7 días en oscuridad o bajo iluminación continua en medio mínimo DGasn sólido. **A** Aspecto de la superficie de las colonias. **B** Contenido de carotenoides de las estirpes incubadas en oscuridad o en la luz.

Expresión de los genes *car* en los transformantes $\Delta carF$

Para determinar si la bajada en la producción de carotenoides en la luz es debida a una menor fotoinducción de la expresión de los genes estructurales de la carotenogénesis, se estudiaron mediante RT-qPCR los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* en micelios incubados durante tres días en medio mínimo DGasn en oscuridad y expuestos después durante una hora a la luz. El análisis se hizo en la estirpe silvestre y en los mutantes $\Delta carF$ SX83 y SX84. Además de los dos genes estructurales, se añadieron al estudio los genes *carS* y *carP*, por ser vecinos a *carF* y por la posibilidad de que pudiera haber algún tipo de conexión regulatoria entre ellos que se manifieste en los niveles de sus transcritos.

El resultado mostró niveles muy similares de ARNm *carRA* y *carB* en los transformantes $\Delta carF$ y en la estirpe silvestre, tanto en oscuridad como tras una hora de iluminación (Figura C4.5). Estos datos sugieren que la bajada de producción de carotenoides en estos transformantes no es debida a una disminución de la expresión de los genes estructurales de la ruta de carotenogénesis. Hay que tener en cuenta que en este experimento se examina la respuesta a la luz de un cultivo previamente incubado en oscuridad, mientras que los datos de carotenoides se realizaron con cultivos permanentemente expuestos a la luz. El resultado, sin embargo, indica que no hay un defecto detectable en la fotoinducción de los genes de la carotenogénesis en los

transformantes $\Delta carF$, por lo cual la diferencia en la síntesis de carotenoides puede estar asociada a un mecanismo de regulación postranscripcional.

Por el contrario, los transformantes $\Delta carF$ muestran un aumento en los niveles de ARNm de los genes *carS* y *carP* de aproximadamente 3-4 veces, manteniendo en todos los casos un aumento similar en la luz respecto a los cultivos incubados en oscuridad. Este resultado sugiere, por tanto, que la proteína CarF desempeña un papel, directo o indirecto, en la transcripción o en la estabilidad de los ARNm de los genes *carP* y *carS*.

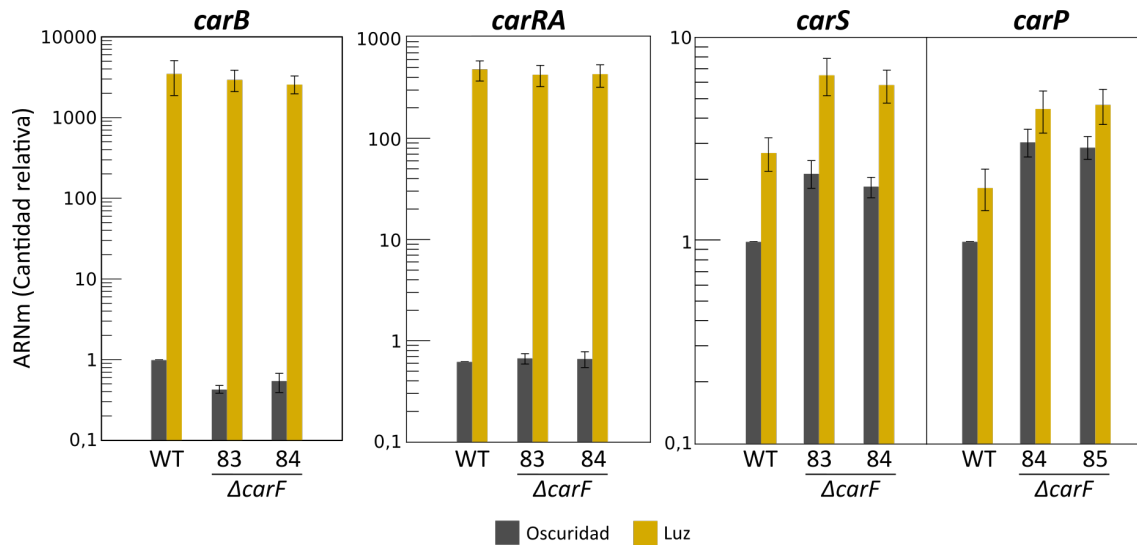


Figura C4.5. Efecto de la delección de *carF* sobre los niveles de ARNm de los genes estructurales *carB* y *carRA*, y los genes reguladores *carS* y *carP*. Las muestras de ARN se obtuvieron a partir de micelio de la estirpe silvestre (WT) y los transformantes *carF* SX83 y SX84 cultivados tres días en oscuridad, seguido en su caso por una hora de exposición a la luz. Los resultados muestran la media y el error típico de 5 réplicas biológicas independientes.

Capítulo 5

Capítulo V. REGULACIÓN DEL *CLUSTER car* A NIVEL DE CROMATINA

Introducción

Como ya se ha mencionado, muchos hongos filamentosos producen un gran arsenal de metabolitos secundarios, compuestos de bajo peso molecular que no son necesarios para la supervivencia del hongo pero que contribuyen de alguna manera a mejorar su eficacia biológica (Fox y Howlett, 2008; Reverberi et al., 2010; Rohlfis y Churchill, 2012). La síntesis de metabolitos secundarios consume energía, por lo que solo se lleva a cabo cuando es ventajoso para el organismo. Para ello los hongos han desarrollado sofisticados mecanismos de regulación, tanto positiva como negativa, que controlan la expresión de los genes responsables. En muchos casos los genes de una misma ruta se organizan en un *cluster* en el genoma (Keller y Hohn, 1997). Estos *clusters* se ubican con frecuencia en regiones subteloméricas y son propensos a ser silenciados a nivel de estructura de la cromatina (Studt et al., 2017).

La cromatina es un complejo de histonas y proteínas no histónicas asociadas con el ADN nuclear, que constituyen el sustrato molecular sobre el que se llevan a cabo todos los procesos celulares del ADN, como son la replicación, la recombinación, la reparación o la transcripción. Desde el punto de vista estructural, la cromatina puede adoptar distintas formas de organización, que implican grados de compactación diferentes. En líneas generales, la cromatina puede estar condensada o relajada. En el primer caso, la cromatina está densamente empaquetada (heterocromatina) y la correspondiente región genómica está transcripcionalmente silenciada. Por el contrario, en el segundo caso la cromatina está desempaquetada (eucromatina) y accesible a la maquinaria de transcripción. El grado de empaquetamiento está asociado al estado químico de las colas de las histonas, que depende de la actividad de ciertas enzimas que forman parte de un complejo dedicado a añadir o eliminar modificaciones químicas en residuos de aminoácidos bien definidos en dichas colas (Bannister y Kouzarides, 2011; Gacek y Strauss, 2012).

Se han desarrollado técnicas experimentales que permiten estudiar la dinámica de la cromatina y las modificaciones que sufre para modular su accesibilidad, como es la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, de *Chromatin immunoprecipitation*). La técnica de ChIP, desarrollada hace unos 30 años (Solomon y Varshavsky, 1985; Solomon et al., 1988), permite determinar y cuantificar la interacción del ADN con las proteínas asociadas *in vivo*. Este método permite averiguar si proteínas específicas, como histonas o factores de transcripción, se encuentran localizadas en una región genómica concreta bajo unas ciertas condiciones experimentales. La técnica original se basa en el análisis de ADN recuperado de una reacción de fijación (*crosslink-decrosslink*), y en la coprecipitación con complejos proteicos. Para estabilizar esta

interacción durante el paso de inmunoprecipitación (IP), las células se tratan con formaldehído *in situ*. El tiempo de exposición y la concentración de formaldehído dependen del organismo y necesitan ser optimizados empíricamente para cada especie y condición experimental. En breve, la cromatina y las proteínas asociadas al ADN se fijan temporalmente, y el ADN genómico se rompe por sonicación para obtener fragmentos de unos 300 - 500 pares de bases. Los anticuerpos que reconocen epítomos en las proteínas diana se añaden a la mezcla de reacción para inmunoprecipitar los complejos proteicos unidos al ADN. Después se revierte la fijación, se digieren los componentes proteicos y se aísla el ADN. Finalmente, la cantidad de ADN precipitado se determina mediante PCR cuantitativa en comparación con el ADN total (Boedi et al., 2012). Esta técnica se ha aplicado con éxito en hongos filamentosos (ver, por ejemplo, Belden et al., 2007; Bernreiter et al., 2007; Gonzalez y Scazzocchio, 1997; Grimaldi et al., 2006).

La expresión de los genes está controlada por distintos tipos de proteínas, que incluyen desde factores de transcripción hasta complejos modificadores de cromatina e histonas. Algunas de las modificaciones de las histonas, habitualmente metilaciones o acetilaciones, se han asociado a la activación transcripcional. Entre ellas figuran, por ejemplo, la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1, H3K4me3, donde se indica la histona, el residuo modificado y el tipo de modificación), la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac), o la modificación de otras lisinas (por ejemplo, H3K27ac, H3K36me3). Otras modificaciones están asociadas al silenciamiento de genes, como la H3K9me3 y la H3K27me3 (Pérez-Lluch et al. 2015).

Los *clusters* de genes para la síntesis de metabolitos secundarios suelen estar sujetos a regulación epigenética a nivel de metilación o acetilación de las histonas, como es el caso de los que forman los genes de las síntesis de giberelinas, bikaverina o fumonisinas (Wiemann et al., 2013). En este capítulo se ha investigado la existencia de modificaciones químicas en las histonas del *cluster car*, representados por los genes *carRA* y *carB*. La investigación se ha extendido a los genes *carS* y *carP*, como reguladores de la ruta, el caso de *carP* por ser un ARNlnc, implicado en la regulación de la carotenogénesis que podría actuar a nivel epigenético a través de modificaciones de la cromatina (Rinn, 2014). Las modificaciones epigenéticas de estos genes se han estudiado en diferentes estirpes y condiciones de regulación. En particular, se ha prestado atención al efecto de la luz, ya que en *N. crassa* la acetilación es requerida para la respuesta a la luz del complejo White collar-1 (Grimaldi et al., 2006), y a la mutación del gen *carS*, como ya se ha hecho anteriormente en los estudios de transcriptómica descritos en el Capítulo 2.

Resultados

Análisis epigenético sobre los genes estructurales de la carotenogénesis

Con el objetivo de averiguar si existe regulación epigenética en el *cluster car* y sus genes reguladores, se ha usado la técnica de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). En el ensayo se han empleado la estirpe silvestre (WT), los mutantes *carS* SX1 y SX2 (descritos en el Capítulo 1), y la estirpe $\Delta carP$ SX82 (descrita en el Capítulo 3). Las estirpes se incubaron durante 3 días en oscuridad y, de forma análoga a otros experimentos descritos en esta Tesis, se iluminaron en su caso durante una hora. Al terminar la incubación, en oscuridad o en luz, los cultivos se fijaron con formaldehído y se sometieron al protocolo de extracción de cromatina (ver Material y Métodos).

Las marcas epigenéticas que se han estudiado son dos de activación, H3K4me3 y H3K9ac, y una de represión, H3K9me3. Los genes investigados fueron *carRA* y *carB*, tanto por ser representativos del *cluster car* como por desempeñar un papel central en la carotenogénesis, y los genes reguladores *carS* y *carP*. También se incluyeron como control de alta expresión el gen de la β -tubulina (*Foxg_06228*), y como control de no expresión el gen *Foxg_05571*, supuestamente silenciado por su proximidad a una de las dos regiones teloméricas del cromosoma II. *Foxg_05571* presenta una expresión inapreciable, como indica la ausencia de lecturas de su transcrito en el análisis ARN-Seq (Figura C5.1).

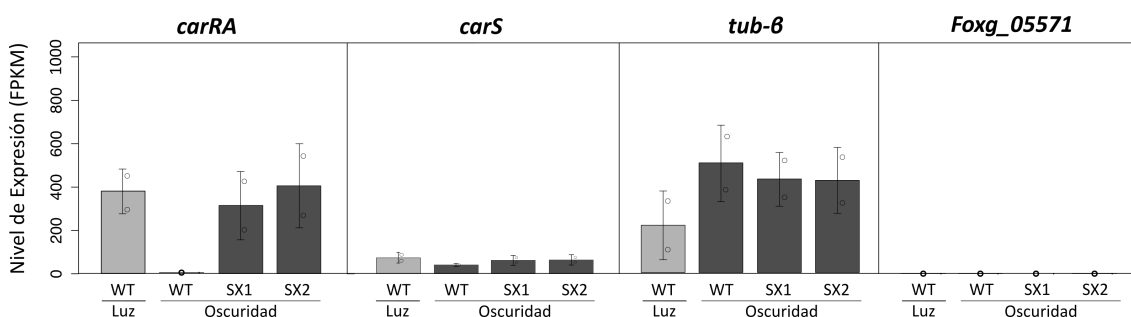


Figura C5.1. Niveles de expresión en el análisis ARN-Seq descrito en el Capítulo 2 para algunos de los genes utilizados en el estudio. Los genes *carRA* y *carS* son los controles internos de expresión. Los genes *Foxg_06228* (*tub-β*) y *Foxg_05571* (región telomérica) son los controles de expresión constitutiva y represión, respectivamente.

El análisis de las marcas epigenéticas se basó en la realización de PCR cuantitativa (qPCR) de ADN inmunoprecipitado con anticuerpos frente a las distintas marcas. Los cebadores utilizados para el análisis de los genes diana (tabla M2 de Material y Métodos) cubren entre 200 y 250 pb en la región 5' del gen diana, ya que ésta es la región donde se suelen establecer las marcas epigenéticas (Ernst et al., 2011). Se estudiaron varias regiones del promotor, pero sólo se analizaron las que cumplían los requisitos óptimos para el análisis de qPCR cuantitativa (descrito en Material y

Métodos). Las posiciones de las regiones estudiadas y analizadas en el análisis cuantitativo se muestran en la Figura C5.2.

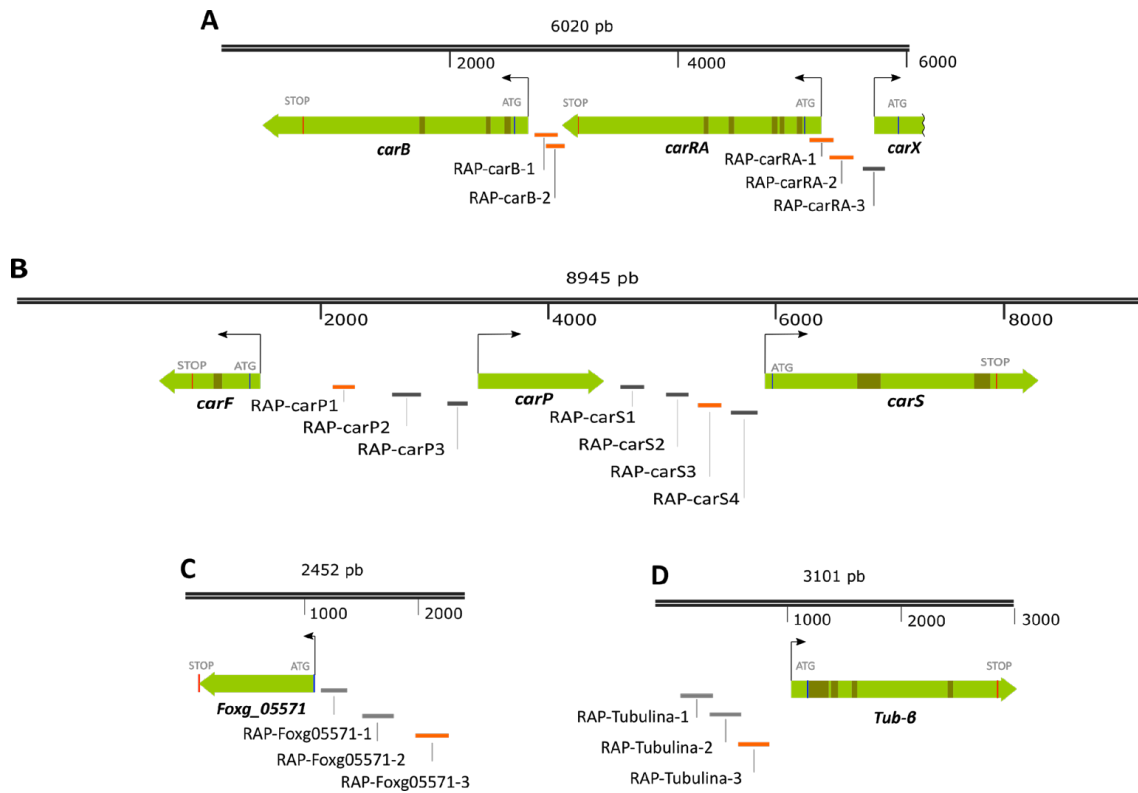


Figura C5.2. Posición en el genoma de las regiones estudiadas en el análisis de qPCR. Se representan los genes y las regiones del promotor estudiadas de cada gen. RAP: Región Amplificada del Promotor, seguida del nombre del gen en cuestión. Las líneas naranjas son las regiones analizadas por qPCR. Las líneas grises son las regiones estudiadas, pero no analizadas por qPCR. **A** Región del cluster *car* con los genes *carRA*, *carB* y parte del gen *carX*. **B** Región que cubre desde el gen *carF* hasta el gen *carS*. **C** Región subteloamérica incluyendo el gen *Foxg_05571*, utilizada como control del análisis. **D** Región con el gen de la β -tubulina (*Foxg_06228*), usado como control de alta expresión.

Marcas de activación y represión en los genes *carRA* y *carB*

Como ya se ha mostrado en resultados anteriores, los genes *carRA* y *carB* de *F. oxysporum* presentaron niveles de ARNm bajos en oscuridad y altos tras una hora de iluminación. Por su parte, los genes *carS* y *carP* mostraron una leve inducción de sus niveles de ARNm en la luz, y parecen desempeñar papeles reguladores contrapuestos, como indican los fenotipos en la carotenogénesis generados por sus mutaciones, alcanzando niveles de ARNm muy altos de los genes estructurales en el caso de los mutantes *carS* y niveles muy bajos en los mutantes $\Delta carP$. El estudio abordado en este capítulo pretende averiguar la posible influencia de las marcas epigenéticas en la regulación de estos genes.

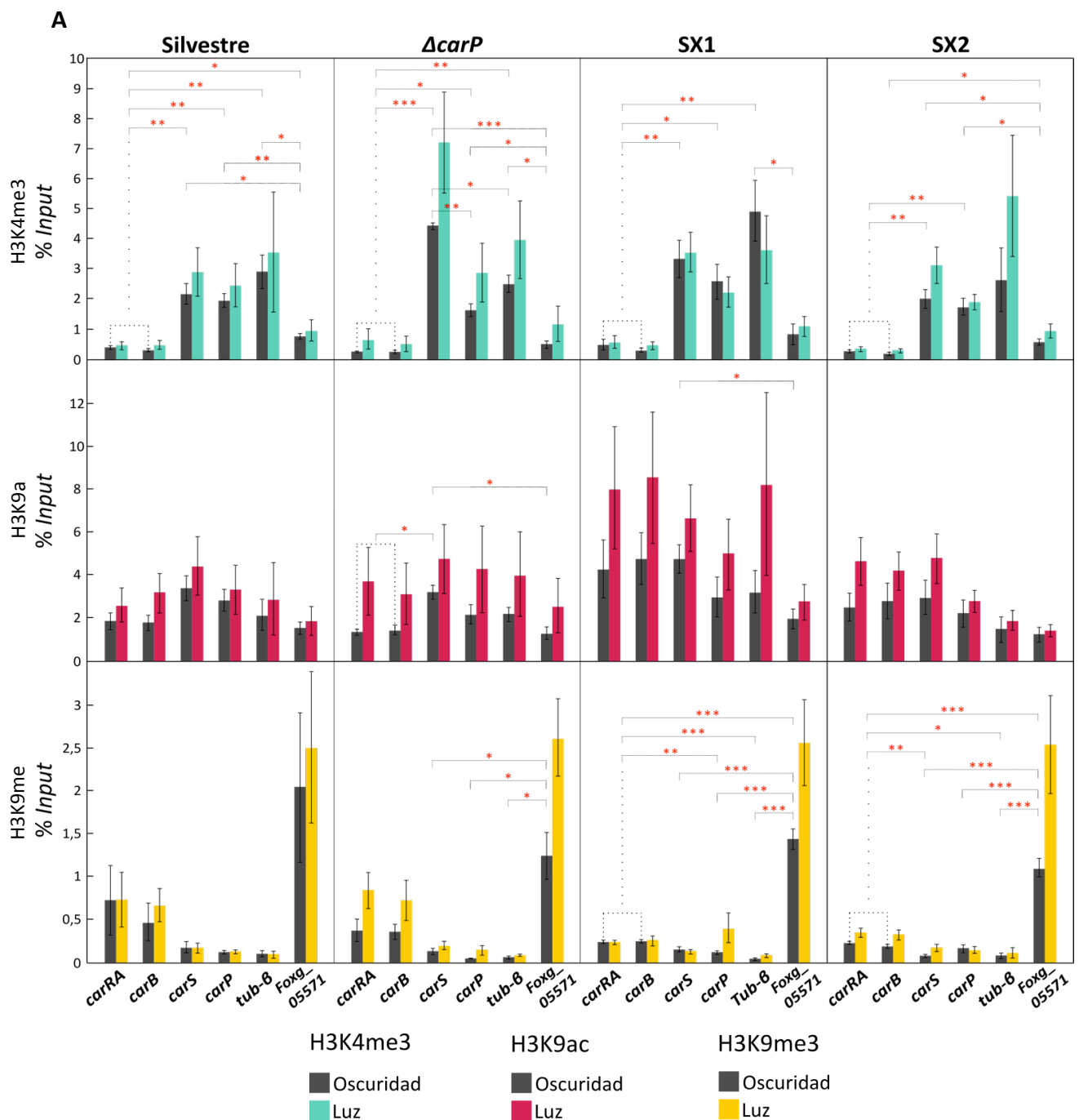
En la Figura C5.3 se describe la relación entre la metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4), la metilación y la acetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9) en los promotores de los genes arriba mencionados, en la estirpe silvestre y en los mutantes *carS* y $\Delta carP$. En la figura se muestra también si las diferencias observadas son estadísticamente significativas de acuerdo con el test de *t-student*, indicando con 1, 2 ó 3 asteriscos los distintos niveles de fiabilidad para las diferencias significativas (datos completos en Anexo II). Para facilitar las comparaciones, los resultados se muestran agrupando los datos por estirpes (Figura C5.3 A) o por genes (Figura C5.3 B).

Aunque es frecuente que la cantidad de señal sea mayor en la luz que en la oscuridad para las tres marcas estudiadas en distintas estirpes y genes analizados, las diferencias no son estadísticamente significativas en ninguno de los casos, por lo que se puede concluir que la luz no es un agente ambiental que actúe de forma relevante a través de estas modificaciones epigenéticas, al menos en estos genes. Se resume a continuación el resultado obtenido para cada una de las marcas con los genes y fondos genéticos investigados, ignorando las diferencias entre luz y oscuridad.

H3K4me3, marca asociada a promotores activos. Los resultados en los genes utilizados como controles coinciden con sus patrones de expresión esperados en todas las estirpes y condiciones: la región 5' del gen de la β -tubulina presenta un enriquecimiento significativo de metilación H3K4, asociada a un nivel elevado de expresión, mientras que en la región 5' del gen subtelomérico *Foxg_05571* se observan niveles bajos de dicha metilación. La considerable diferencia en los patrones de expresión de estos genes, obtenidos en los análisis de RNA-Seq descritos en el Capítulo 2, se muestran en la figura C5.1. Sin embargo, contra lo que cabría esperar, los genes *carRA* y *carB* presentaron niveles muy bajos de esta marca epigenética con independencia de la cantidad de carotenoides de la estirpe y condición estudiada, incluyendo los mutantes *carS*, en los que la expresión de ambos genes es muy elevada. Por el contrario, las regiones 5' de los genes *carS* y *carP* presentaron niveles altos de metilación H3K4me3, con valores próximos al gen constitutivo de la β -tubulina en todas las estirpes. Los niveles de esta metilación fueron especialmente elevados para el gen *carS* en la estirpe $\Delta carP$ en relación a las otras las estirpes (Figura C5.3 B).

H3K9ac, marca asociada a promotores activos (Karmodiya et al., 2012). Los datos de esta marca son más ambiguos, ya que los niveles observados fueron menos variables entre las distintas estirpes o los genes analizados. Así, en este caso, las diferencias fueron menores entre los dos genes control, con niveles sólo algo mayores en el gen de la β -tubulina que en el control subexpresado *Foxg_05571*. Tampoco ayudan a una interpretación más clara las diferencias observadas entre los dos mutantes *carS*, con niveles en general mayores en SX1 que en SX2.

H3K9me3, marca asociada a heterocromatina, es decir, el estado de la cromatina condensada y transcripcionalmente inactiva (Lehnertz et al., 2003). Como era de esperar, se observó el patrón opuesto a la marca de activación H3k4me3, evidenciada claramente por los niveles contrapuestos observados para los dos genes control, muy elevados en el gen *Foxg_05571* y muy bajos en el gen de la β -tubulina. En general, los niveles fueron muy bajos en el resto de los genes, indicando que se ubicaría en la cromatina transcripcionalmente activa, pero es aparentemente un poco más alta en los genes *carRA* y *carB* tanto en la estirpe silvestre y en el mutante $\Delta carP$ como en los mutantes *carS*, lo cual puede estar asociado al mayor nivel de expresión en estos últimos. Sin embargo, la diferencia no es estadísticamente significativa.



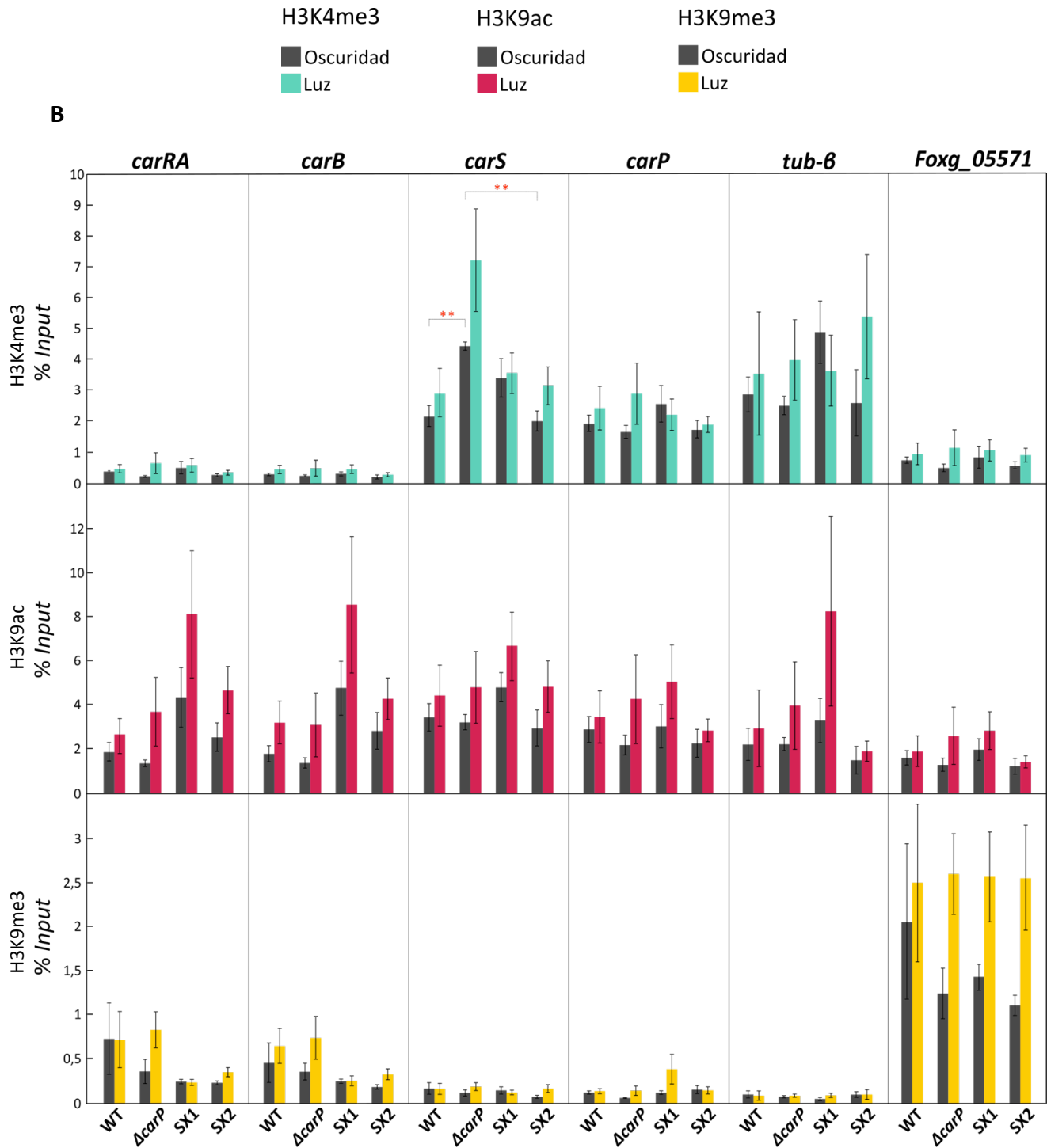


Figura C5.3. Niveles de las marcas epigenéticas H3K4me3, H3K9ac y H3K9me3 en la región 5' de los genes *car* en la estirpe silvestre y en los mutantes $\Delta carP$, SX1 y SX2 en oscuridad o tras una hora de iluminación. **A** Representación agrupando los datos por estirpes. **B** Representación agrupando los datos por genes. Se representa la media y el error típico del porcentaje de enriquecimiento de la marca con respecto al *Input* (cromatina total) en cuatro réplicas biológicas independientes. Los asteriscos indican una diferencia significativa en el enriquecimiento de la marca ($p < 0.05$). Se representan los mismos datos en los paneles A y B con distintas comparaciones para facilitar tanto la interpretación de los datos como la representación de las diferencias estadísticas.

En conclusión, los datos sugieren que las modificaciones epigenéticas no desempeñan un papel importante en la regulación de los genes estructurales *carRA* y *carB*, pero sí pueden desempeñar un papel relevante en el control de la expresión de los genes *carS* y *carP*.

Extensión del análisis de H3K4me3 a una región adyacente en los promotores de los genes *carRA* y *carB*

La metilación en la lisina 4 de la histona H3, una de las modificaciones de histonas más estudiadas, se ha asociado con mucha frecuencia a promotores de genes activos, especialmente a genes constitutivos (Barski et al., 2007). En los datos mostrados en el apartado anterior, los niveles de esa metilación en los genes *carRA* y *carB* fueron muy bajos en todas las condiciones, incluyendo en los mutantes *carS* SX1 y SX2, que muestran una transcripción muy activa de ambos genes. Existe la posibilidad de que la regulación por esta metilación se ubique en otra región de los promotores de *carRA* y *carB*. Para comprobar esta hipótesis, se diseñaron nuevas parejas de cebadores que cubrieran una zona más extensa de la región 5' de ambos genes. Este nuevo análisis cubre unos 200 pb de la región promotora (Figura C5.1) y se realizó mediante la misma técnica para los mismos genes, estirpes y condiciones descritas en el apartado anterior (Figura C5.4).

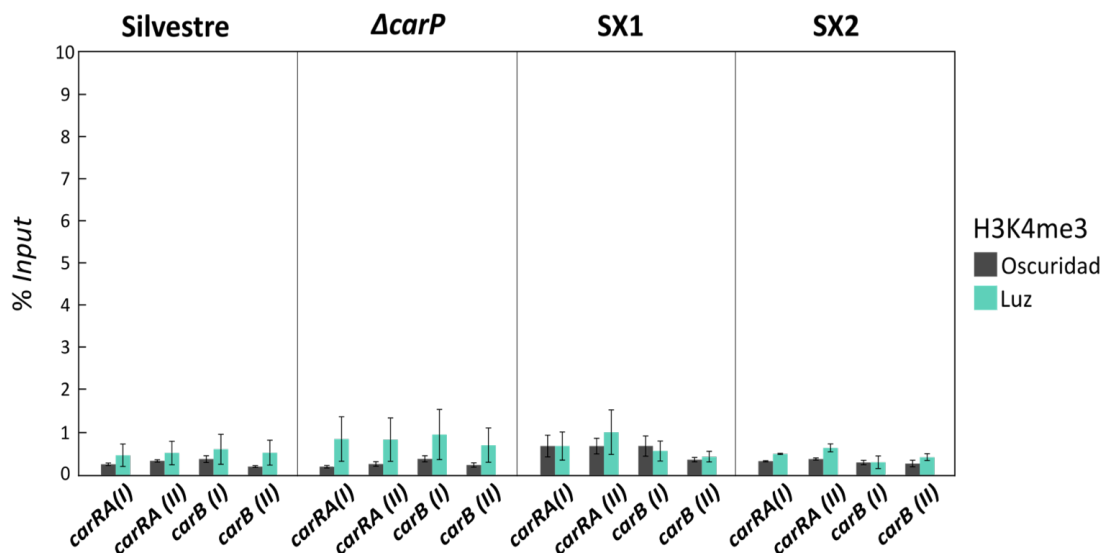


Figura C5.4. Niveles de la marca H3K4me3 en la región 5' de los genes *carRA* y *carB* de la estirpe silvestre y de los mutantes $\Delta carP$, SX1 y SX2. *carRA* (I) y *carB* (I): zona amplificada por la pareja de cebadores del experimento anterior (ChIP-QPCR-*carRA*-*carX*-1F/ChIP-QPCR-*carRA*-*carX*-1R y ChIP-QPCR-*carB*-2F/ ChIP-QPCR- *carB*-2R, respectivamente). *carRA* (II) y *carB* (II): zona amplificada con los nuevos cebadores (ChIP-QPCR-*carRA*-*carX*-2F/ ChIP-QPCR-*carRA*-*carX*-2R y ChIP-QPCR-*carB*-1F/ ChIP-QPCR-*carB*-1R, respectivamente). Las estirpes se incubaron en la oscuridad y, en su caso, se iluminaron durante una hora. Los datos representan la media y el error típico del porcentaje de enriquecimiento de la marca con respecto al *Input* (cromatina total) de dos réplicas biológicas independientes.

Los resultados volvieron a mostrar niveles bajos de metilación H3K4me3 para *carRA* y *carB* en todos los mutantes analizados, en oscuridad o tras una hora de luz. Por tanto, la metilación H3K4me3, no parece estar asociada a la activación de la transcripción por luz de los genes estructurales de la carotenogénesis, al menos en las estirpes y condiciones estudiadas.

Efecto del tiempo de iluminación sobre las marcas activadoras

Como ya se ha indicado en la introducción, tal como ocurre en otras especies del género *Fusarium*, la luz es una señal activadora de la transcripción de los genes de la carotenogénesis en *F. oxysporum*. En las condiciones empleadas, los niveles de ARNm de los genes estructurales (por ejemplo, *carRA* y *carB*) alcanzan su nivel máximo a los 60 minutos de exposición a la luz (Rodríguez-Ortiz et al., 2012). Dado que tras este tiempo de iluminación no se observan cambios importantes en las señales activadoras, nos planteamos la hipótesis de que dichas señales puedan actuar transitoriamente, y que lo hagan en tiempos más cortos de iluminación. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la presencia de las marcas activadoras H3K4me3 y H3K9ac tras distintos tiempos de iluminación. En concreto, los cultivos incubados durante 3 días en oscuridad se iluminaron durante 2,5, 5, 10, 30 y 60 min. Debido al elevado número de muestras, este estudio se limitó a la estirpe silvestre.

Los resultados mostraron una subida transitoria en la metilación tras un breve pulso de iluminación para todos los genes analizados (Figura C5.5). Sin embargo, dicha subida se apreció también en los genes control y la magnitud de la subida fue modesta y estadísticamente no significativa. Por tanto, este efecto no parece ser relevante y, de ser real, puede tener otras causas no relacionadas con la existencia de regulación. Se observó también una cierta tendencia a la subida con tiempos más largos de iluminación pero, de nuevo, las diferencias no fueron muy llamativas. Especialmente informativo fue el escaso efecto de la luz en los niveles de metilación H3K4me3 en los genes *carRA* y *carB*, que confirman que la luz actúa con independencia de esta marca epigenética. Sin embargo, la subida de la marca H3K9ac por efecto de la luz fue un poco más patente, pero las diferencias siguieron sin ser significativas, lo cual contrasta con el drástico efecto que ejerce la luz sobre la transcripción de *carRA* y *carB*. Los resultados no fueron muy diferentes para los genes *carS* y *carP*, aunque en ambos casos se trata de dos genes cuyos niveles de ARNm se ven menos influidos por la luz.

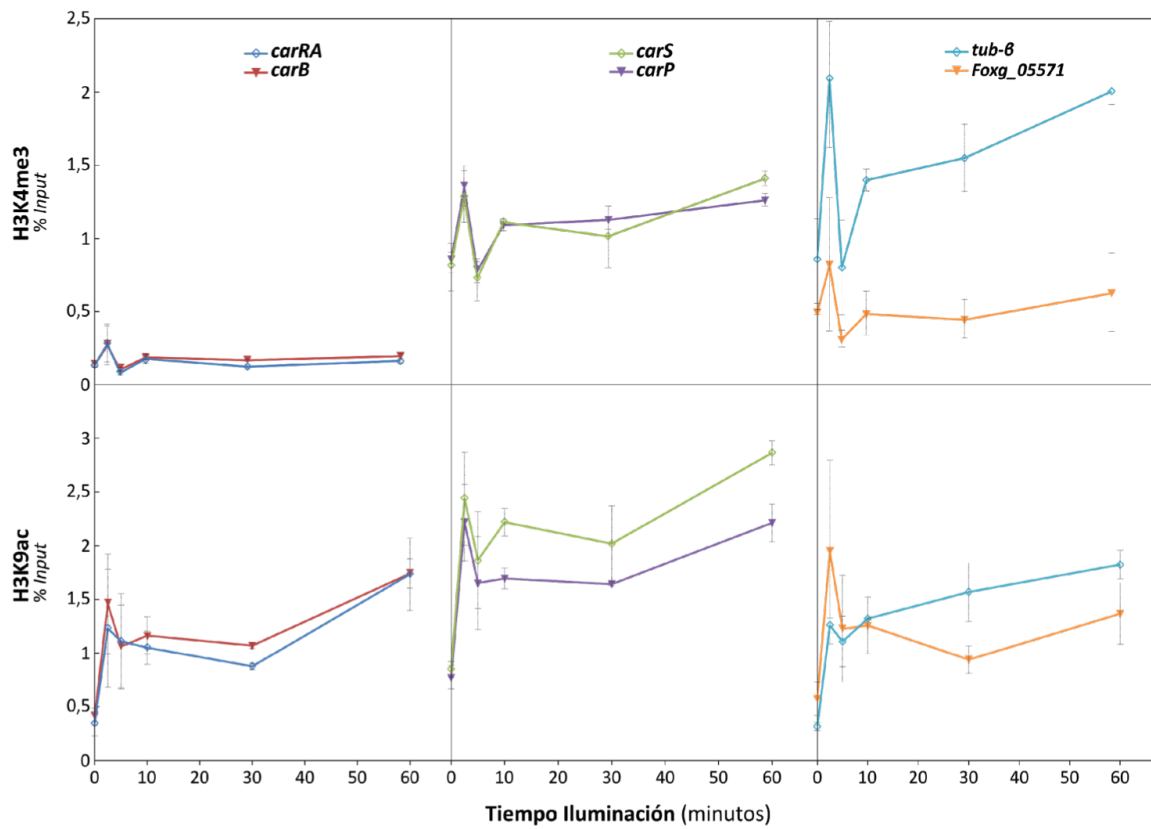


Figura C5.5. Efecto del tiempo de exposición a la luz sobre los niveles de las marcas de activación de H3K4me3 y H3K9ac en los promotores de los genes indicados en la estirpe silvestre. Se utilizaron las regiones 5' de los genes *carRA*, *carB*, *carS*, *carP* y de los controles para el gen de la β -tubulina y *Foxg_05571*. Los tiempos de iluminación fueron de 2,5, 5, 10, 30 y 60 minutos. Los datos muestran la media y el error de la media del porcentaje de enriquecimiento de la marca con respecto al *Input* (cromatina total) en dos réplicas biológicas independientes.

Discusión

DISCUSIÓN

La regulación de la síntesis de carotenoides en *Fusarium sp.* ha sido objeto de atención durante más de 50 años, desde los estudios pioneros de la regulación por la luz en *Fusarium aquaeductuum* (revisado por Avalos y Estrada, 2010). La identificación de los genes implicados en la regulación empezó con el desarrollo de técnicas eficaces de mutagénesis, que hicieron posible las primeras búsquedas sistemáticas de mutantes de la pigmentación (Avalos et al., 1985), y el hallazgo de los primeros mutantes de la regulación. Entre ellos llamaron muy pronto la atención una clase de mutantes con una fuerte pigmentación anaranjada bajo cualquiera de las condiciones de cultivo ensayadas, debido a su alta acumulación de carotenoides (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). Estos mutantes se denominaron *carS* por su similitud con el fenotipo de los mutantes *carS* de *P. blakesleeana* (Cerdá-Olmedo, 1987). Los mutantes *carS* constituyeron un fondo genético muy útil en la identificación de nuevos mutantes afectados en la ruta, ya que permiten distinguir con más facilidad los cambios en la tonalidad debidos a la acumulación de otros carotenoides (ver, Prado-Cabrero et al., 2007b, 2009; Díaz Sánchez et al., 2011). Desde el hallazgo de los primeros mutantes se ha avanzado considerablemente en la identificación de los genes para todos los pasos enzimáticos de la ruta (revisado por Avalos et al., 2017), pero no tanto en la comprensión de los detalles moleculares de los mecanismos de regulación.

El agente ambiental más conocido que controla la carotenogénesis en *Fusarium* es la luz, y los primeros estudios en *F. aquaeductuum* ya dilucidaron algunos aspectos básicos de esta respuesta, como son la sensibilidad a distintas longitudes de onda (Rau, 1967) o la cinética de estimulación (Bindl et al., 1970). Recientemente se ha avanzado considerablemente en este mecanismo de regulación con la caracterización de los genes de tres fotorreceptores implicados en la respuesta, la proteína “White collar” WcoA, el criptocromo CryD y la flavoproteína VvdA, entre las que WcoA (llamada Wco1 en *F. oxysporum*) desempeña un papel esencial en la respuesta a nivel de transcripción. Sin embargo, en los últimos años la identificación del gen *carS* abrió un nuevo campo de estudio, del cual deriva indirectamente el trabajo de investigación descrito en esta Tesis.

El gen *carS* se descubrió inicialmente en *F. oxysporum* gracias al escrutinio de una colección de transformantes insercionales de ADN-T mediados por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Rodríguez-Ortiz et al., 2012). El hallazgo fue indirecto, ya que ninguno de los tres transformantes poseía una inserción de ADN-T en el gen *carS*. Sin embargo, se encontraron alteraciones en las regiones vecinas no codificantes en dos de ellos, que permitieron dirigir la atención a este gen por su parecido con el gen *crgA* de *M. circinelloides* (Navarro et al., 2001), y que llevaron además a sospechar la

existencia de presuntos ARNs reguladores, cuyo estudio es uno de los motivos de este trabajo. Posteriormente se confirmó también la identidad del gen *carS* genéticamente en *F. fujikuroi* (Rodríguez-Ortiz et al., 2013), donde se encontraron estos mutantes originalmente (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). La función de CarS en la carotenogénesis no está claro que esté conservada en todas las especies de *Fusarium*, ya que una búsqueda intensiva de mutantes superproductores de carotenoides en *F. verticillioides* no dio resultado (J. García-Martínez, datos no publicados).

Mecanismo de acción y función de la proteína CarS

El mecanismo de acción de CarS es aún desconocido. Tanto por sus características como proteína de la familia RING-Finger, como por datos previos del grupo, no hay ningún indicio que haga pensar que CarS sea un factor transcripcional que actúe directamente sobre los promotores de los genes estructurales de la carotenogénesis. Por su similitud estructural con la proteína CrgA de *M. circinelloides*, se sospecha que CarS puede interaccionar con otras moléculas reguladoras, muy probablemente otras proteínas, que modulen directa o indirectamente la expresión de los genes de la carotenogénesis. Tanto CarS como CrgA tienen al menos dos partes bien diferenciadas: una región con dos dominios *Ring Finger* (RF) y un dominio proteasa LON.

La proteína CarS estaba inicialmente mal anotada en el genoma de *F. fujikuroi*, ya que la asignación errónea de un intrón llevó a pasar por alto la existencia del segundo dominio RF, coincidente con su secuencia. Sin embargo, un estudio de transcriptómica llevado a cabo en esta especie (Ruger-Herreros, 2016) reveló que dicho intrón no se elimina y que CarS contiene un segundo dominio RF. Los datos de transcriptómica del Capítulo 2 han confirmado este dato también para la proteína CarS de *F. oxysporum*. Sin embargo, en este caso se detecta la eliminación eventual del intrón (Figura C2.8, Capítulo 2), dando lugar a dos transcritos diferentes. La maduración alternativa de intrones no es un fenómeno desconocido en *Fusarium*, pues ya se había descrito en *F. graminearum* (Zhao et al., 2013). Se da la circunstancia de que el intrón de CarS tiene un número de bases múltiplo de tres, y que carece de codones de terminación, por lo que se espera que se traduzcan dos variantes de la proteína CarS. A juzgar por la baja frecuencia de eliminación del intrón, la forma predominante es la proteína CarS con dos dominios RF respecto a la versión más corta con un solo dominio RF. Se desconoce si existen diferencias funcionales entre las dos variantes de CarS.

Con independencia del mecanismo de acción molecular, los datos de transcriptómica global descritos en el Capítulo 2 revelan interesantes características sobre la función de la proteína CarS. Como ya se observó para la mutación del gen *carS*

en *F. fujikuroi* (Ruger-Herreros, 2016), los datos indican que la mutación de este gen tiene un impacto global en la expresión de numerosos genes de *F. oxysporum*, con más de 500 genes cuyos niveles de ARNm suben a más del doble o bajan a menos de la mitad en los dos mutantes *carS* analizados. La mayoría de los genes sufren cambios menores, pero la coincidencia tanto en las dos estirpes como en las dos réplicas biológicas de cada estirpe apoyan fuertemente el cambio observado. Las funciones de los genes afectados son diversas, pero entre ellos se incluyen los genes del *cluster car*, cuya función es producir la rodopsina CarO y su cromóforo, el retinal. La clasificación global en categorías funcionales de acuerdo con los dominios Pfam, que no incluye los genes de la carotenogénesis, detecta una sobreabundancia de genes del grupo del metabolismo de moléculas pequeñas, y en menor medida, de reparación del ADN y adhesión celular, lo que apunta a una considerable diversidad funcional.

En el mismo estudio se incluyó el efecto de la luz sobre la estirpe silvestre. Como cabe esperar, la luz tiene un impacto considerable en el transcriptoma, acercándose al millar el número de genes afectados con el mismo criterio empleado para el efecto de la mutación *carS*. Sin embargo, y a pesar de que los mutantes *carS* mantienen la regulación por la luz de la síntesis de carotenoides (Prado-Cabrero et al., 2007a; revisado por Avalos et al., 2017), aproximadamente el 41% de los genes activados por la mutación *carS* son también activados por la luz, y aproximadamente un 25% de los genes activados por la luz son también activados por la mutación *carS*, entre los que se encuentran los genes estructurales de la carotenogénesis, con la excepción del gen *carD*. Esos porcentajes son algo más bajos en el caso de los genes reprimidos por la mutación *carS* o por la luz (34% y 15%, respectivamente), pero mucho más altos, en cualquier caso, que los esperados por azar teniendo en cuenta que el genoma de *F. oxysporum* tiene unos 18.000 genes. El elevado grado de coincidencia entre los genes influidos por la luz o por la mutación *carS* indica conexiones regulatorias o funcionales entre el control por la luz y por la proteína CarS. Tal conexión, sin embargo, no se detecta en el análisis de las abundancias relativas de categorías funcionales de acuerdo con los dominios Pfam, cuyas categorías con mayor proporción de genes influidos por la luz son distintas a las categorías de los genes influidos por la mutación *carS*.

Elementos reguladores de la carotenogénesis en la región intergénica anterior al gen *carS*

Además de los mutantes *carS* SX1 y SX2, con mutaciones identificadas en el gen *carS*, se conocen en *F. oxysporum* dos estirpes con mayor contenido de carotenoides en la oscuridad que la estirpe silvestre, y que no tienen alteraciones en la secuencia del gen *carS* (Rodríguez-Ortíz, 2012). Las dos estirpes, llamadas T2 y T3, son

transformantes obtenidos por inserciones de ADN-T mediadas por *A. tumefaciens* y poseen la inserción de ADN-T en la región genómica próxima al gen *carS*. Estas inserciones no parecen alterar ningún otro marco abierto de lectura de otros genes anotados en esta región del genoma de *F. oxysporum*, posicionándose en la región intergénica entre el gen *Foxg_09306* y el gen *carS* en T2, y entre *Foxg_09305* y *Foxg_09306* en T3. Además, en el caso de T3 se identificó una alteración en la secuencia entre *Foxg_09306* y el gen *carS* de naturaleza desconocida. A juzgar por la coincidencia con la localización del ADN-T en el transformante T2, esta alteración puede ser la causante de su fenotipo desregulado para la carotenogénesis. Es interesante recalcar que los fenotipos de T2 y de T3 son parecidos, pero no idénticos, ya que T2 tiene más carotenoides en la oscuridad que T3, y su patrón de acumulación de carotenoides es muy similar al de los mutantes SX1 y SX2. Sin embargo, de forma análoga a estos mutantes, tanto T2 como T3 poseen niveles anormalmente altos de ARNm de los genes estructurales de la carotenogénesis tanto en luz como en oscuridad.

En un primer intento por comprender las causas moleculares del fenotipo desregulado de la carotenogénesis en los transformantes T2 y T3, se hizo una búsqueda de posibles elementos reguladores en la región intergénica entre *Foxg_09306* y *carS* (Rodríguez-Ortíz, 2012). Un programa de predicción de genes precursores de microARNs encontró dos secuencias candidatas, que en espera de su confirmación molecular recibieron los nombres de *fox-mir-1* y *fox-mir-2*. Los microARN son ARN interferentes de unos 20-25 nucleótidos generados a partir de precursores no codificantes, que al transcribirse se pliegan por apareamientos internos para formar horquillas que contienen segmentos de complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en dos etapas, catalizado por las enzimas Drosha en el núcleo y Dicer en el citoplasma. La mayoría de los microARN estudiados regulan negativamente la expresión de sus genes diana a nivel postranscripcional (Bartel, 2004; Lai, 2003). Los microARNs pueden inhibir la traducción de ARNm o bien inducir su degradación, iniciándose con la eliminación de la cola poliadenilada del ARNm (Pillai, 2005; Bartel, 2004). Están en estudio actualmente en el mismo grupo donde se ha realizado este trabajo la función de las proteínas Dicer de *F. fujikuroi* mediante sus mutaciones dirigidas en el genoma.

Los resultados descritos en el Capítulo 2 permiten replantearse las causas moleculares que producen los fenotipos de T2 y de T3. La transcriptómica de ARNs pequeños ha descartado la presencia de microARNs en la región anterior al gen *carS*, pero ha identificado en su lugar un ARN largo no codificante, supuestamente poliadenilado, que se ha denominado *carP* por la pérdida de fotoinducción de la carotenogénesis que produce su mutación. Este gen no fue identificado originalmente en la anotación del genoma, ya que ésta se basa sobre todo en la predicción de ORFs,

es decir, secuencias codificantes sin interrupciones con una longitud significativamente larga. Como toda secuencia de ADN, la secuencia del gen *carP* incluye varios ORFs. La más extensa tiene 131 aminoácidos, un tamaño que no permite descartar que se trate de una proteína funcional. Sin embargo, aunque el gen homólogo a *carP* en *F. fujikuroi* tiene la misma función (los mutantes $\Delta carP$ de esta especie muestran el mismo fenotipo albino) y tiene una alta similitud de secuencia con *carP* de *F. oxysporum*, 75 % de identidad), los dos genes tienen patrones de ORFs muy distintos (J. Pardo Medina, datos no publicados). De hecho, el ORF de 131 aminoácidos no figura en los ORFs de *F. fujikuroi*, ni siquiera un fragmento de ella.

La orientación del transcrito *carP* se ha establecido mediante PCR específica de cadena, y el mismo resultado se ha obtenido en *F. fujikuroi* (J. Pardo Medina, datos no publicados). Sin embargo, tampoco se ha observado ningún paralelismo entre los ORFs de ambos genes en la dirección opuesta. Otro dato especialmente informativo es que el alineamiento de los genes *carP* de ambas especies muestra numerosos huecos de muy pocas bases, que indica que sus secuencias han evolucionado manteniendo su función, aunque se alteren sus pautas de lectura. Considerados globalmente, la información respalda de forma muy sólida la naturaleza no codificante de *carP*.

Una vez asentada la naturaleza del ARN regulador aguas arriba de *carS*, se debe tener en cuenta su existencia para la interpretación tanto de las delecciones dirigidas de los supuestos precursores de microARN realizadas en el Capítulo 1, como de los efectos de la inserción de ADN-T en el transformante T2 o de la secuencia alterada en el transformante T3.

Base molecular del fenotipo de los transformantes T2 y T3

Se conoce la ubicación precisa de las inserciones de ADN-T en los transformantes T2 y T3; sin embargo, en el caso de T3, se desconocen los detalles de la alteración molecular sufrida entre el gen *carP* y el gen *carS*. Aunque los datos disponibles la sitúan más cerca de *carP* que la inserción de ADN-T en la estirpe T2 (Rodríguez-Ortiz, 2012), solo se pudo deducir que esa región está alterada por las diferencias observadas en una hibridación *Southern*, empleando como sonda un segmento de ADN del gen *Foxg_09305*, vecino a *Foxg_09306* (*carF*). De hecho, la alteración puede afectar a la región 5' del transcrito *carP*. Los intentos de amplificar por PCR la secuencia alterada no dieron ningún resultado (Rodríguez-Ortiz, 2012), lo cual sugiere que se ha producido una inserción de un tamaño suficiente para impedir su amplificación con cebadores circundantes. Será necesario, por tanto, realizar la secuenciación del genoma de esta estirpe para entender la naturaleza molecular de la alteración causante de este fenotipo.

A pesar de las diferencias moleculares y fenotípicas entre los transformantes T2 y T3, los datos de ARN-Seq mostraron un elevado grado de coincidencia en los genes afectados. Dicha coincidencia es especialmente alta en el caso de los genes reprimidos, mucho más abundantes que para los genes sobreexpresados en ambas estirpes (Figura C2.4). El resultado más significativo sobre la alteración regulatoria en estos transformantes se obtuvo con la visualización de las lecturas en la región próxima al gen *carP*, que mostró una región transcripcionalmente silenciada que abarca desde el promotor del gen *carF* hasta el gen *Foxg_09312*. La región silenciada incluye tanto al gen *carS* como al gen *carP*. Aunque se desconoce aún el fenotipo del doble mutante *carS/carP*, por el fenotipo mostrado por los transformantes T2 y T3, cabe suponer que la mutación *carS* será epistática sobre *carP*. Dicho de otra forma, si ambos genes estuvieran funcionalmente relacionados, *carP* ejercería influencia sobre *carS* y no al contrario. Es importante resaltar que el silenciamiento es más completo en T2 que en T3, habiendo aún en este último niveles detectables del transcrito *carS*, lo cual explica su fenotipo menos drástico que el mostrado por T2.

La región silenciada en los transformantes T2 y T3 arranca aproximadamente en los lugares con la inserción de ADN-T en el primer caso o con el ADN alterado en el segundo. Por tanto, cabe suponer una relación directa causa-efecto. La información disponible sobre los otros genes afectados por el silenciamiento no aporta información relevante. Los tres genes siguientes a *carS* son *Foxg_09308*, que cifra una proteína de 534 aminoácidos (código de acceso XP_018246454) de función desconocida, *Foxg_09309*, que codifica una supuesta fosfo-CoA quinasa de 231 aminoácidos (XP_018246455) y *Foxg_17768*, que codifica otra proteína de 193 aminoácidos (XP_018246463) de función desconocida. La reacción supuestamente llevada a cabo por *Foxg_09309* es: $ATP + \text{defosfo-CoA} \leftrightarrow ADP + \text{CoA}$, y forma parte de la biosíntesis de pantotenato y CoA. Los primeros pasos de la síntesis de terpenoides empiezan por el acetil coenzima A, pero probablemente se trata de una relación accidental, ya que hay terpenoides esenciales que se deben seguir sintetizando, como es el caso de los esteroides, por lo que sin duda la célula conserva la capacidad de sintetizar CoA. El hecho de que cubra una región de 12 kb sugiere una conexión con un mecanismo de regulación epigenético que cubra una región cromatínica, más que un efecto individual sobre cada gen.

Un aspecto especialmente intrigante de los transformantes T2 y T3 es el elevado número de genes cuya expresión se ve alterada de forma importante en las dos estirpes. La lista de genes con un grado de represión mayor (Tabla C2.6) muestra una fuerte predominancia de genes para proteínas de función desconocida, y las de función conocida no guardan ninguna relación aparente. Llama la atención sin embargo la tendencia a incluir genes contiguos, lo que sugiere que los transformantes tienen otras regiones genómicas inactivadas que incluyen a varios genes.

Posible función de *carP* como ARN no codificante

Las técnicas modernas de transcriptómica global están cambiando en gran medida la perspectiva que se tenía sobre las funciones codificantes de los genomas, ya que están revelando, en un número creciente de organismos eucariotas, que la proporción de ARNs sin capacidad de codificar proteínas es mucho mayor de lo que se esperaba. En humanos, sólo el 2% de los genes codifican proteínas, considerando el resto como ARNs no codificantes (Ponting et al., 2009). Se han descrito muchos tipos de ARNs no codificantes; sin embargo, trabajos recientes revelan la importancia de los “long non-coding” (ARNlnc), definidos como ARNs no codificantes de más de 200 pb de longitud. Aunque han sido pocos los caracterizados hasta la fecha, los estudios revelan que pueden regular la expresión de otros genes a nivel transcripcional, postranscripcional y epigenético (Wapinski y Chang, 2011). Los ARNlnc pueden actuar directamente en el mensajero de su gen diana, positiva o negativamente, afectando a su traducción. Su efecto sobre la estabilidad del ARN mensajero es a través del apareamiento de las bases de los ARNlnCs y el ARNm, que puede tanto proteger al ARN de la degradación como acelerarla (Guhaniyogi y Brewer, 2001).

Además de su longitud, los ARNlnCs poseen otras características propias. La mayoría de ellos son transcritos por la ARN Polimerasa II, de forma similar a los ARNs mensajeros, de manera que sufren sus mismas modificaciones postranscripcionales: la caperuza en su extremo 5' y la adición de la cola poli(A) en el extremo 3' (Du toit, 2013). Los ARNlnCs regulan la expresión de otros genes a través de diversos mecanismos, que en muchos casos permanecen aún confusos (Mercer et al., 2009, 2013; Whitehead et al., 2009; Wilusz et al., 2009). Los ARNlnc supuestamente ortólogos tienden a mostrar una débil conservación de secuencias entre organismos (Pang et al., 2006), aunque conserven su función. Los ARNm requieren una ORF continua con secuencia conservada y funcional. Por el contrario, como su propio nombre indica, los ARNlnc carecen de ORFs conservadas, pero mantienen una estructura y función propias (revisado por Quan et al., 2015).

Aunque abundan los estudios sobre ARNlnCs en mamíferos o plantas, se han caracterizado ARNlnCs también en microorganismos, tales como las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Yamashita et al., 2016). Hasta la fecha, sólo se ha caracterizado un ARNlnc en hongos filamentosos, en *T. reesei* (Till et al., 2018b), que promueve un impacto regulador en la expresión de la celulasas. Un estudio de secuenciación masiva de ARN ha revelado también la intervención de ARNlnCs en la regulación de la expresión de genes en *N. crassa* (Arthanori et al., 2014). Por las características descritas en el Capítulo 3, el transcrito de *carP* reúne todos los requisitos para ser considerado como un ARN regulador no codificante tipo ARNlnc en *F. oxysporum*. Su

mecanismo de acción es totalmente desconocido y será objeto de atención de futuros trabajos.

Los intentos de búsqueda de secuencias internas de *carP* que aparezcan con secuencias parciales de posibles ARNm diana, como los de los genes reguladores *carS* o *wcoA/wco1*, o los de los genes estructurales de la carotenogénesis, dieron resultados negativos. La búsqueda se llevó a cabo con criterios objetivos, empleando el programa *Clustal Omega*, y el resultado reveló que no existen secuencias similares de más de 20 pb con más del 50% de identidad, un umbral por debajo del cual se encuentran segmentos que aparecen parcialmente con cualquier gen al azar. Este dato parece descartar una función directa por apareamiento de *carP* sobre los ARN de los genes de interés. No se descartan, sin embargo, otros tipos de mecanismos, como podría ser aquellos basados en una conformación tridimensional específica del transcrito. De esta forma, el ARN *carP* podría interferir sobre la función de una proteína reguladora, que podría ser la propia proteína CarS. Una hipótesis muy sugerente sería que el ARN *carP* se uniera a CarS y bloqueara su función represora, de forma que la ausencia de *carP* dejaría a CarS libre para reprimir la síntesis de carotenoides. De ser así, la luz podría ejercer su función activadora, al menos parcialmente, a nivel de *carP*, facilitando su unión a CarS. No se descartan otros mecanismos de acción para *carP*, por ejemplo, a nivel epigenético, reclutando las secuencias diana sobre las que actuarían algunas proteínas de la maquinaria de modificación de histonas, como parece sugerir la participación de las modificaciones epigenéticas en la regulación del gen *carS* o del propio gen *carP*, según se describe en el Capítulo 5.

El gen *carP* se encuentra en la proximidad de los promotores de los genes *carF* y *carS*, por lo cual también podría actuar como un regulador transcripcional sobre sus genes vecinos codificadores de proteínas, como se ha descrito para la regulación del gen *SER3* por el ARNinc *SRGI* en *S. cerevisiae* (Martens et al., 2004). Eso es precisamente lo que se observa, ya que los mutantes $\Delta carP$ muestran un aumento en los niveles de ARNm de sus genes vecinos, *carS* (Figura C3.7) y *carF* (Figura C4.5). Otras posibilidades regulatorias pueden consistir en el control de ARNm diana a nivel de su cola poli(A) o en su maduración alternativa. En eucariotas se conocen ejemplos de producción de distintas proteínas en función de la variedad de otros transcritos previos reguladores que modulan su maduración alternativa (Blencowe, 2006; Hallegger et al., 2010; Licatalosi et al., 2010).

Relación entre el gen *carP* y los supuestos genes precursores de microARN *fox-mir-1* y *fox-mir-2*

En el Capítulo 1 se investigó la posible función de los supuestos genes precursores de los microARN *fox-mir-1* y *fox-mir-2*. Estos experimentos se hicieron con anterioridad a conocer la existencia del gen *carP*. Aunque los datos de transcriptómica de ARNs pequeños descartaron la existencia de tales microARN, al menos en las condiciones experimentales y fondos genéticos relevantes en este trabajo, el estudio de la expresión y delección de estas secuencias aporta información complementaria de gran valor respecto a la descrita en el Capítulo 3 sobre el gen *carP* y su función.

La secuencia del supuesto *fox-mir-2* es solapante casi en su totalidad con el final del transcrito del gen *carP*. A pesar de que alrededor del 60% de la secuencia de *carP* (659 de 1178 pb) se conserva tras la delección de *fox-mir-2*, las consecuencias de esta delección sobre la síntesis de carotenoides y sobre la expresión de los genes *car* son las mismas que las producidas por la delección completa de *carP*. Este resultado se debe interpretar como que la región del extremo 3' de *carP* desempeña un papel esencial en su función, pero eso no significa que no sea esencial también el resto del transcrito, como ocurriría si la función dependiera de la estructura global del ARN más que de ciertas secuencias concretas. Otra consecuencia interesante de la disponibilidad de esta mutación parcial es que permite deducir si *carP* participa en la regulación de su propia transcripción. Los resultados muestran niveles muy similares en la oscuridad para el ARN *carP* en la estirpe silvestre y en los mutantes $\Delta mir2$, pero no en la luz, ya que se aprecia la pérdida de la fotoinducción que se manifiesta en la estirpe silvestre. Es interesante resaltar que *carP* impide la fotoinducción de los niveles de ARNm de los genes *car*, por lo cual ambos efectos deben tener la misma causa, la participación de *carP* en dicho proceso de fotoinducción. Sin embargo, la caída de los niveles de ARNm de estos genes no se debe a una pérdida de la expresión de los genes implicados en la maquinaria de fotorrecepción, ya que no se ven afectados los niveles de transcritos de los genes *wcoA*, *cryD* y *vvdA*.

La interpretación de los resultados es más compleja en el caso del supuesto *fox-mir-1*, ya que su secuencia se ubica en la región reguladora que separa los genes *carP* y *carF*. Como consecuencia, los efectos fenotípicos resultantes de su delección pueden deberse a alteraciones en la expresión de cualquiera de estos dos genes. De hecho, en los Capítulos 3 y 4 se observa que la delección de *fox-mir-1* eleva tanto los niveles de ARN de *carP* (Figura C3.4) como los de ARNm de *carF* (Figura C3.2). Este resultado se explicaría por la presencia de algún elemento de regulación negativo en dicha secuencia que afecte negativamente a la transcripción desde ambos promotores, lo cual aporta indicios de una expresión coordinada de ambos genes. Es importante recordar, sin embargo, que las delecciones de *carF* y de *carP* producen descensos de la

síntesis de carotenoides, en el primer caso parcial y en el segundo caso más drástico. Por tanto, el aumento inducido de los niveles de ARNm de estos genes debería producir el fenotipo opuesto, es decir, un aumento de la síntesis de carotenoides. Sin embargo, se detectó un aumento en los niveles de transcrito de los genes *carF* y *carP* en los mutantes $\Delta mir1$, observándose el efecto contrario al esperado, en el que los mutantes tienen disminuida la capacidad de síntesis de carotenoides. La explicación puede estar en el aumento de los niveles de transcrito del gen *carS* producido tanto por las deleciones de *fox-mir-1* y de *fox-mir-2*, que correlacionan con el grado de inhibición de la síntesis de carotenoides en la luz.

En las lecturas del análisis RNA-Seq de la región de *carP* (Figura C3.1) se observaron trazas de un transcrito que aumentaba su expresión perceptiblemente en la luz. Este dato se confirmó por la detección de ARN mediante RT-qPCR, que muestra una fuerte inducción por la luz en la estirpe silvestre y un aumento en la oscuridad en los mutantes *carS* (Figura C1.4). Aunque según los datos de RNA-Seq la cantidad de transcrito era mínima, no se puede descartar que éste tenga una vida media muy efímera. Cabe por tanto especular que este ARN puede desempeñar una función asociada a la fotoinducción de la carotenogénesis, y que el fenotipo observado en el mutante $\Delta fox-mir-1$ se deba a su ausencia, con independencia de los efectos sobre la expresión de los genes vecinos. Aunque esta hipótesis no parece muy plausible a juzgar por los bajos niveles de transcrito detectados, merece al menos esta breve mención.

Aunque el análisis en masa de ARNs pequeños llevado a cabo no haya encontrado microARNs correspondientes a la región del gen *carP* (Capítulo 2), su solapamiento con la secuencia de *fox-mir2* deja abierta la posibilidad de que pueda actuar de precursor de uno o más microARNs. De hecho, algunos ARNlncs han sido identificados como precursores de pequeños ARNs (Rother y Meister, 2011). La no detección de microARNs asociados a la región de *carP* en las condiciones de cultivo y variantes regulatorias en las que se estudia la carotenogénesis en esta Tesis, hacen muy improbable la participación de microARNs en dicha regulación. Sin embargo, los ARNlnc pueden interactuar con miRNAs para regular la actividad de estos y controlar de esta forma la traducción del ARN mensajeros diana (revisado por Quan et al., 2015). De la misma forma que se ha averiguado que CarS tiene muchas otras dianas regulatorias además de los genes de la carotenogénesis, *carP* podría desempeñar funciones más amplias en la fisiología del hongo. Serán necesarios estudios de transcriptómica global para averiguar si la mutación *carP* afecta a los niveles de ARNm de otros genes en el genoma de *F. oxysporum*.

La proteína CarF: un nuevo elemento en la maquinaria de regulación de la carotenogénesis en *Fusarium*

En la anotación original del genoma de *F. oxysporum*, el gen *carF* está situado en el otro extremo de la larga región supuestamente intergénica que precede al gen *carS*, y en la que posteriormente se ha identificado el gen *carP*. En principio, *carF* no es más que uno más de los centenares de genes cuyos niveles de ARNm aumentan en la luz, lo cual no llama lo suficiente la atención para un estudio más detallado. Sin embargo, sus niveles de ARNm suben de forma considerable tanto en el mutante $\Delta mir1$ como en el transformante T2, lo cual levantó dudas sobre su posible implicación en el fenotipo de sobreproducción de carotenoides. Además, *carF* se transcribe de forma divergente con el gen *carP*, que también es fotoinducible, lo que sugiere posibles conexiones regulatorias y funcionales entre ambos genes. De hecho, como se discute más abajo, la delección de *carP* produce un aumento en los niveles de ARNm de *carF*, aunque en principio no está claro que este efecto sea causado por la ausencia del ARN de *carP* o por haberse alterado la secuencia promotora de *carF*.

La delección de *carF* provoca una reducción de aproximadamente un 50% en la síntesis de carotenoides en la luz. Este fenotipo, que se manifiesta de forma muy visible en un aspecto más pálido de sus colonias, explica el nombre asignado al gen, que recuerda el efecto de su mutación sobre la fotoinducción. Sin embargo, en contra de lo que se esperaba, no se encontró en los mutantes $\Delta carF$ ningún cambio en la respuesta a una hora de iluminación de los niveles de ARNm de los genes estructurales *carRA* y *carB*. Para la interpretación de estos resultados es necesario tener en cuenta que la fotoinducción de los niveles de ARNm no se estudia en las mismas condiciones en las que se determina el contenido de carotenoides. El motivo es que, debido a la transitoriedad de la respuesta transcripcional a la luz, la fotoinducción se investiga con una exposición corta a la luz de un cultivo previamente incubado en oscuridad. Sin embargo, la medida de carotenoides se lleva a cabo en colonias cultivadas permanentemente a la luz, ya que el contenido en carotenoides en los experimentos de fotoinducción son más reducidos. En condiciones de iluminación continua, el contenido en ARNm se mantiene a niveles más bajos durante todo el tiempo debido a la existencia de un mecanismo de fotoadaptación. Como referencia, en *F. fujikuroi* los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* son solo 2 y 7 veces mayores bajo iluminación continua que en la oscuridad, mientras que en los experimentos de fotoinducción dichos niveles se incrementan unas 100 veces al cabo de una hora de iluminación para bajar después (Castrillo et al., 2015). Sería deseable comprobar los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* en los mutantes $\Delta carF$ bajo estas condiciones. No sería sorprendente que dichos niveles fueran sensiblemente más bajos, teniendo en cuenta que los niveles de ARNm *carS* es más elevado en los mutantes $\Delta carF$ que en la estirpe silvestre.

De confirmarse una falta de efecto a nivel de ARNm de los genes de la carotenogénesis en los mutantes $\Delta carF$, la proteína CarF podría ejercer su función a nivel postranscripcional, por ejemplo, a nivel de traducción de los ARNm o a nivel de actividad de algunas de las enzimas implicadas. Cualquier hipótesis es posible si consideramos que la proteína CarF no tiene ningún dominio reconocible o ningún parecido con proteínas de función conocida. CarF es una proteína soluble y de pequeño tamaño, ya que solo tiene 142 aminoácidos. Esta proteína es ubicua en el género *Fusarium*, donde muestra una considerable diversidad de secuencia a pesar de tratarse de especies muy emparentadas (desde 94% de identidad con FFUJ_08715 de *F. fujikuroi*, hasta 67% con FPSE_06172 de *F. pseudograminearum*). En un BLAST frente la colección completa de secuencias de nucleótidos a través del servidor del NCBI se encuentran también ortólogos reconocibles en algunos hongos, con las mayores identidades en especies del género *Colletotrichum* (la más alta, 56% de identidad con los 138 aminoácidos de CI238_12241 de *Colletotrichum incanum*), seguido de *Acremonium chrysogenum* (51% de identidad con los 141 aminoácidos de ACRE_07487). A partir de ahí las identidades bajan del 50% en un número reducido de especies, hasta llegar pronto a niveles de identidad no significativos. Se trata, por tanto, de una proteína sin un ortólogo claro en la mayoría de los genomas de los hongos secuenciados y que puede desempeñar por tanto un papel altamente especializado.

Es interesante resaltar que la mutación $\Delta carF$ produjo un aumento de los niveles de transcritos de *carP* y *carS* (Figura C4.5). Este resultado recuerda a resultados previos, ya que la mutación $\Delta carP$ conduce a un aumento en los niveles de ARNm de *carS* (Figura C3.7) y *carF* (Figura C3.2) y los mutantes *carS* muestran un aumento en los niveles de transcritos de *carP* (Figura C3.4) y *carF* (Figura C3.2, en este caso solo en oscuridad). En resumen, los productos de cualquiera de estos tres genes, que se encuentran contiguos en el genoma, ejercen influencia sobre los niveles de transcrito de sus dos genes vecinos, indicando que constituyen un juego regulatorio que actúa de forma integrada. Se desconoce todavía la relación funcional entre las proteínas CarF y CarS, y el ARNinc *carP*, pero el esclarecimiento de sus mecanismos moleculares constituye en este momento uno de los objetivos principales de la línea de investigación en la que se enmarca este trabajo.

Regulación a nivel epigenético del *cluster car*.

El último capítulo del trabajo aborda la existencia de una regulación a nivel epigenético de la síntesis de carotenoides en *Fusarium*. En otros hongos se han encontrado conexiones regulatorias entre procesos regulados por la luz por proteínas White Collar y mecanismos de remodelación de cromatina. Ese es el caso de *N. crassa*

(revisado por Proietto et *al.*, 2015), un modelo ampliamente usado en fotobiología. En este hongo, la estimulación de la transcripción mediada por luz por el complejo White Collar incluye la acetilación de la histona H3 en la lisina 14 por la acetil transferasa NGF-1 (Grimaldi et *al.*, 2006), con la que interacciona físicamente (Brenna et *al.*, 2012). Otro ejemplo lo ofrece *Aspergillus nidulans*, un hongo en el que la estimulación por la luz a través de un fitocromo y la proteína White Collar requiere la acetilación de la histona H3 en su lisina 9 (Hedtke et *al.*, 2015). En *Fusarium*, el papel central que desempeña la proteína White collar en la inducción transcripcional de los genes de la carotenogénesis sugiere también la mediación de mecanismos epigenéticos. Por ello, se ha investigado la correlación entre la expresión de los genes estructurales, representados por *carRA* y *carB*. Dentro del enfoque de esta Tesis, se ha centrado la atención en la posible participación de los genes *carS* y *carP*, extendiendo el estudio además a los mutantes de estos genes.

De manera canónica, las modificaciones de histonas se han asociado a la expresión/represión de genes dependiendo de la modificación existente. En colaboración con el grupo del Dr. J. Carlos Reyes (CABIMER, CSIC, Sevilla), se ha investigado las modificaciones H3K4me3 y H3K9ac, que están asociadas de forma general a la activación transcripcional, y la modificación H3K9me3, usualmente asociada a la represión transcripcional (Black et *al.*, 2012; Wagner y Carpenter, 2012). Los resultados obtenidos para los genes y fondos genéticos investigados han aportado datos relevantes para la marca de activación H3K4me3, pero no así para las marcas de activación H3K9ac y de represión H3K9me3, que no parecen ejercer una influencia importante en la regulación de los genes estudiados.

Los patrones de H3K4me3 fueron inesperados, ya que sus niveles en los genes estructurales *carRA* y *carB* fueron incluso inferiores que para el gen ubicado en la región subtelomérica, utilizada como control de silenciamiento génico y del que ya se conocía la ausencia de transcritos por los datos de RNA-Seq. Cabría esperar que en condiciones de oscuridad, la marca H3K4me3 estuviera presente en mayor cantidad para los genes *carRA* y *carB* en los mutantes superproductores de carotenoides, donde la transcripción para estos genes parece ser mucho más activa que en la estirpe silvestre. No se apreció, sin embargo, ninguna diferencia. De igual forma, cabría esperar un incremento detectable de esta marca tras una hora de iluminación respecto a la oscuridad en la estirpe silvestre. Por el contrario, no se detectaron cambios significativos entre luz y oscuridad, incluso cuando este estudio se extendió a una cinética de iluminación para verificar que la modificación de la histona no se produjera con anterioridad a los 60 minutos de exposición a la luz, tiempo en el que los ARNm de los genes estructurales presentan su máximo nivel.

Los resultados indican que la activación de la transcripción de los genes estructurales de la carotenogénesis no está regulada por la metilación de lisina 4 o la acetilación en lisina 9, ambas en la histona H3, pero no descartan la regulación por otras marcas menos canónicas, como ocurre con la acetilación en la lisina 14 de la misma histona en *N. crassa* (Grimaldi et al., 2006). La diversidad de las marcas en las histonas aumenta la versatilidad en la regulación epigenética. Recientemente se identificó un grupo de genes en *Drosophila melanogaster* que se activan en ciertas fases del desarrollo en ausencia de las marcas de histonas canónicas para ello (Pérez-Lluch et al., 2015), lo cual puede ser debido a requerimientos específicos de la rapidez de respuesta. No sorprende que los genes estructurales y los genes reguladores tengan mecanismos de control diferentes, y de hecho, en el caso de las modificaciones estudiadas, se encontraron niveles de H3K4me3 más elevados en los genes reguladores *carS* y *carP*, que fueron incluso superiores que para el gen *tub-β*, utilizado como control positivo de activación.

Los ARNlnCs pueden estar también implicados en mecanismos de regulación epigenética, siendo conocida la participación de algunos ejemplos en la metilación del ADN (Werner et al., 2017). En los resultados mostrados en el Capítulo 5 no se aprecian diferencias relevantes para las distintas marcas entre el mutante $\Delta carP$ y la estirpe silvestre para los genes estructurales *carRA* y *carB* o para el propio gen *carP*, pero sí para el gen *carS*, cuyo marca H3K4me3 aumenta sensiblemente en ausencia de *carP*. Por tanto, *carP* puede actuar, al menos en parte, sobre el control del gen *carS* a nivel epigenético. Llama la atención, sin embargo, la ausencia de una subida de esta marca para los genes *carRA* y *carB* en los mutantes *carS*, como cabría esperar de su elevada expresión en estos mutantes. Todo parece indicar que los resultados obtenidos son parciales, y que serán necesarios extender los estudios a otras marcas, para tener un cuadro más completo de la relevancia de las modificaciones epigenéticas en la regulación de la carotenogénesis.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El fenotipo superproductor de carotenoides presentado por los mutantes insercionales T2 y T3, con inserciones de ADN-T mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, es debido al silenciamiento de una región genómica alrededor del gen *carS*, situada entre los genes *Foxg_09306* (*carF*) y *Foxg_09312*.
2. La luz y la proteína CarS ejercen influencia directa o indirecta sobre los niveles de ARNm de centenares de genes en *F. oxysporum*, entre los que existe un grado de coincidencia mucho mayor que lo esperado por azar, lo que implica conexiones funcionales o moleculares entre ambos factores regulatorios.
3. Distintas evidencias indican la existencia de un gen que se transcribe para un ARNnc, situado en la región anterior al gen *carS*. El ARNnc resultante de este gen, que se ha denominado *carP*, es un regulador positivo de la carotenogénesis en *F. oxysporum*, como indica la drástica reducción de la expresión de los genes estructurales que produce su delección.
4. El gen *carF* (*Foxg_09306*), ligado a *carP* y *carS*, codifica una pequeña proteína sin dominios estructurales conocidos, y que desempeña un papel en la regulación de carotenogénesis, ya que su delección disminuye la síntesis de carotenoides a la mitad.
5. Los genes *carF*, *carP* y *carS* indican la existencia de una región genómica implicada en la regulación de la carotenogénesis. La delección o la mutación de cualquiera de estos genes altera los niveles de ARNm de los otros dos, lo que sugiere una acción regulatoria coordinada.
6. Las marcas epigenéticas estudiadas, H3K4me3, H3K9me3 y H3K9ac, no desempeñan un papel relevante en la regulación de los genes estructurales de la carotenogénesis *carB* y *carRA*. Sin embargo, los resultados sugieren que al menos una de ellas, H3K4me3, parece interpretar un papel relevante sobre los genes reguladores de la carotenogénesis, *carP* y *carS*.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Aasen AJ, Jensen SL (1965). Fungal carotenoids. II. The structure of the carotenoid acid neurospora-xanthin. *Acta Chem. Scand.* 19, 1843–1853.
- Adám AL, García-Martínez J, Szücs EP, Avalos J, Hornok L (2011). The MAT1-2-1 mating-type gene upregulates photo-inducible carotenoid biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *FEMS Microbiol. Lett* 318, 76-83.
- Agrios GN (1997). Plant Pathology. San Diego, CA, EEUU, Academic Press Inc.
- Agrios GN (2005). Plant Pathology. San Diego, CA, EEUU, Academic Press Inc.
- Anaya N, Roncero MI (1995). Skippy, a retrotransposon from the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Gen. Genet.* 20, 637-647.
- Armstrong GM, Armstrong JK (1981). *Forma especiales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. *Fusarium: disease, biology, and taxonomy*, PE Nelson, Tousson, TA, and Cook, RJ, ed (University Park, PA, Pennsylvania State University Press) pp: 391-399.
- Arrach N, Fernández-Martín R, Cerdá-Olmedo E, Avalos J (2001). A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 1687-1692.
- Arrach N, Schmidhauser TJ, Avalos J (2002). Mutants of the carotene cyclase domain of *al-2* from *Neurospora crassa*. *Mol. Genet. Genomics.* 266, 914-921.
- Arthanari Y, Heintzen C, Griffiths-Jones S, Crosthwaite SK (2014). Natural antisense transcripts and long non-coding RNA in *Neurospora crassa*. *PLoS One* 9:e91353.
- Auer PL, Doerge RW (2010). Statistical design and analysis of RNA sequencing data. *Genetics* 185, 405-416.
- Austin DJ, Bu'Lock JD, Drake D (1970). The biosynthesis of trisporic acids from beta-carotene via retinal and trisporol. *Experientia* 26, 384-349.
- Avalos J, Bejarano ER, Cerdá-Olmedo E (1993). Photoinduction of carotenoid biosynthesis. *Methods Enzymol.* 214, 283-294.
- Avalos J, Casadesús J, Cerdá-Olmedo E (1985). *Gibberella fujikuroi* mutants obtained with UV radiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 187-191.
- Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1986). Chemical modification of carotenogenesis in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 25, 1837-1841.
- Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1987). Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Curr. Genet.* 25, 1837-1841.
- Avalos J, Cerdá-Olmedo E (2004). Fungal carotenoids production. *Handbook of Fungal Biotechnology* 2nd. Edit. (Arora, DK ed.). Marcel Dekker. New York. pp. 367-379.
- Avalos J, Cerdá-Olmedo E, Reyes F, Barrer AF (2007). Gibberellins and other metabolites of *Fusarium fujikuroi* and related fungi. *Curr. Org. Chem.* 11, 721-737.

- Avalos J, Corrochano LM (2013). Carotenoid biosynthesis in *Neurospora*. In *Neurospora: Genomics and Molecular Biology*; Kasbekar DP, McCluskey K Eds: Caister Academic Press: Norfolk, UK, pp. 227-247.
- Avalos J, Díaz-Sánchez V, García-Martínez J, Castrillo M, Ruger Herreros M, Limón MC (2014). Carotenoids. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*. Springer, pp. 149-185.
- Avalos J, Estrada AF (2010). Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 930-938.
- Avalos J, Pardo-Medina J, Parra-Rivero O, Ruger-Herreros M, Rodríguez-Ortiz R, Hornero-Méndez D, Limón MC (2017). Carotenoid Biosynthesis in *Fusarium*. *J. Fungi* 3, 39.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381-395.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and Function. *Cell* 116, 281-297.
- Beckman CH (1987). The Nature of Wilt Diseases of Plants. *St Paul, MN (EEUU) APS Press*.
- Belden WJ, Loros JJ, Dunlap JC (2007). Execution of the circadian negative feedback loop in *Neurospora* requires the ATP-dependent chromatin-remodeling enzyme CLOCKSWITCH. *Mol. Cell* 25, 587-600.
- Bernreiter A, Ramón A, Fernández-Martínez J, Berger H, Araújo-Bazan L, Espeso EA et al. (2007). Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* 27, 791-802.
- Bernstein BE, Binery E, Dunham I, Green ED, Gunter C, et al. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74.
- Bindl E, Lang W, Rau W (1970). Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. VI. Zeitlicher Verlauf der Synthese der einzelnen Carotinoide bei *Fusarium aquaeductuum* unter verschiedenen Induktionsbedingungen. *Planta, Springer* 94, 156-174.
- Binery E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, et al. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot Project. *Nature* 447, 799-816.
- Black JC, van Rechem C, Whetstone JR (2012). Histone lysine methylation dynamics: Establishment, regulation, and biological impact. *Mol. Cell* 48, 491-507.
- Blencowe BJ (2006). Alternative splicing. New insights from global analyses. *Cell* 126, 37-47.
- Blount JD, Metcalfe NB, Birkhead TR, Suari PF (2003). Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* 300, 125-127.
- Boedi S, Reyes-Dominguez Y, Strauss J (2012). Chromatin Immunoprecipitation analysis in filamentous fungi. *Fungal Secondary Metabolism: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology*, 944. Chapter 16.
- Booth C (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, pp. 237.

- Brenna A, Grimaldi B, Filetici P, Ballario P (2012). Physical association of the WC-1 photoreceptor and the histone acetyltransferase NGF-1 is required for blue light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* 23, 3863–3872.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (1998). Carotenoids, Vols. 1, 2 y 3, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Bruno VM, Wang Z, Marjani SL, Euskirchen GM, Martin J, Sherlock G, Snyder M (2010). Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* using RNA-seq. *Genome Res.* 20, 1451-1458.
- Candau R, Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1991). Gibberellins and carotenoids in the wild type and mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3378-3382.
- Carlile MJ (1956). A study of the factors influencing non-genetic variation in a strain of *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Microbiol* 14, 643-654.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, et al. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.
- Castrillo M, Avalos J (2014). Light-mediated participation of the VIVID-like protein of *Fusarium fujikuroi* VvdA in pigmentation and development. *Fungal Genet. Biol.* 71, 9-20.
- Castrillo M, Avalos J (2015). The flavoproteins CryD and VvdA cooperate with the White collar protein WcoA in the control of photocarotenogenesis in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS ONE* 10, e0119785.
- Castrillo M, Bernhardt A, Avalos J, Batschauer A, Pokorny R (2015). Biochemical characterization of the DASH-type cryptochrome CryD from *Fusarium fujikuroi*. *Photochem. Photobiol.* 91, 1356-1367.
- Cerdá-Olmedo E (1987). Carotene in *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo E, L.E., ed.), *Cold Spring Harbor*, New York. pp. 199-122.
- Colot HV, Park G, Park G, Turner GE, Ringelberg C et al. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *PNAS* 103, 10352-10357.
- Conn PF, Schalch W, Truscott TG (1991). The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J Photochem Photobiol B* 11, 41-47.
- Connolly LR, Smith KM, Freitag M (2013). The *Fusarium graminearum* Histone H3 K27 methyltransferase KMT6 regulates development and expression of secondary metabolite gene clusters. *PLoS Genet.* 9, e1003916.
- Core L, Waterfall JJ, Lis JT (2008). Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322 (5909), 1845-1848.
- Cullen D, Leong SA, Wilson LJ, Henner DJ (1987). Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, *hph*. *Gene* 57, 21-26.
- Cuttriss AJ, Pogson BJ (2006). Carotenoids, In: The Structure and Function of Plastids (Wise RR y Hooper JK eds). The Structure and function of Plastids. Dordrecht, The Netherlands, Springer pp. 315-334.
- Davis RH (2000). *Neurospora*. Contributions of a model organism. *Genetics Research* 77.

- De Fabo EC, Harding RW, Shropshire W (1976). Action spectrum between 260 and 800 nanometers for the photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* 57, 440-445.
- Degnan PH, Ochman H (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *ISME J.* 6, 183-194.
- Del Solar G, Espinosa M (2000). Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol. Microbiol* 37, 492-500.
- Desjardins AE (2006). *Fusarium mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*. *Plant Pathology*, 56.
- Desjardins AE, Proctor RH (2007). Molecular biology of *Fusarium mycotoxins*. *Int. J. Food. Microbiol* 119, 47-50.
- Díaz-Sánchez V, Estrada AF, Trautmann D, Al-Babili S, Avalos J (2011a). The gene *carD* encodes the aldehyde dehydrogenase responsible for neurosporaxanthin biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*. *FEBS J.* 278, 3164-3167.
- Díaz-Sánchez V, Estrada AF, Trautmann D, Limón MC, Al-Babili S, Avalos J (2011b). Analysis of *al-2* mutations in *Neurospora*. *PloS ONE* 6, e21949.
- Díaz-Sánchez V, Limón MC, Schaub P, Al-Babili S, Avalos J (2016). A RALDH-like enzyme involved in *Fusarium verticillioides* development. *Fungal Genet. Biol.* 86, 20-32.
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, et al. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101-108.
- Domenech CE, Giordano W, Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1996). Separate compartment for the production of sterols, carotenoids and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Eur. J. Biochem.* 239, 720-725.
- Du Toit A (2013). Non-coding RNA: RNA stability control by Pol II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 128-129.
- Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG (1997). The carotenoids as anti-oxidants--a review. *J Photochem. Photobiol. B.* 41, 189-200.
- Egan AN, Schlueter J, Spooner DM (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *Am. J. Bot* 99, 175-185.
- Eggersdorfer M, Wyss A (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 18-26.
- Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shores N, Ward LD, et al. (2011). Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* 473, 43-49.
- Estrada AF, Avalos J (2008). The White Collar protein WcoA of *Fusarium fujikuroi* is not essential for photocarotenogenesis, but is involved in the regulation of secondary metabolism and conidiation. *Fungal Genet. Biol* 45, 705-718.
- Estrada AF, Avalos J (2009). Regulation and targeted mutation of *opsA*, coding for the NOP-1 opsin orthologue in *Fusarium fujikuroi*. *J. Mol. Biol.* 387, 59-73.

- Estrada AF, Youssar L, Scherzinger D, Al-Babili S, Avalos J (2008). The *ylo-1* gene encodes an aldehyde dehydrogenase responsible for the last reaction in the *Neurospora* carotenoid pathway. *Mol. Microbiol.* 69, 1207-1220.
- Faivre B, Grégoire A, Prérault M, Cézilly F, Sorci G (2003). Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science* 300, 103.
- Fernández-Martín R, Cerdá-Olmedo E, Avalos J (2000). Homologous recombination and allele replacement in transformants of *Fusarium fujikuroi*. *Mol. Gen. Genet.* 263, 838-845.
- Filichkin SA, Priest HD, Givan SA, Shen R, Bryant DW, Fox SE, Wong WK, Mockler TC (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* 20, 45-58.
- Fischer R, Aguirre J, Herrera-Estrella A, Corrochano LM (2016). The complexity of fungal vision. *Microbiol. Spectr.* 4, 1-22.
- Flury I, Garza R, Shearer A, Rosen J, Cronin S, Hampton RY (2005). INSIG: a broadly conserved transmembrane chaperone for sterol-sensing domain proteins. *EMBO J.* 24, 3917-3927.
- Fox EM, Howlett BJ (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 481-487.
- Fraser PD, Ruiz-Hidalgo MJ, López-Matas MA, Alvarez MI, Eslava AP, Bramley PM (1996). Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circinelloides*. *Biochim. Biophys. Acta* 1289, 203-208.
- Gacek A, Strauss J (2012). The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1389-1404.
- Gaffoor I, Brown DW, Plattner R, Proctor RH, Qj W, Trail F (2005). Functional analysis of the polyketide synthase genes in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Eukariot Cell* 4, 1926-1933.
- Garbayo I, Vílchez C, Nava-Saucedo JE, Barbotin JN (2003). Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 629-634.
- Garber M, Grabherr MG, Guttman M, Trapnell C (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*, 8, 469-477.
- Gessler NN, Sokolov AV, Bykhovskii Vla, Belozerskaia TA (2002). Superoxide dismutase and catalase activities in carotenoid-synthesizing fungi *Blakeslea trispora* and *Neurospora crassa* under the oxidative stress. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 38, 205-209.
- Gietz RD, Woods RA (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* 350, 87-96.
- Goldie AH, Subden RE (1973). The neutral carotenoids of wild-type and mutant strains of *Neurospora crassa*. *Biochem. Genet.* 10, 275-284.
- Gonzalez R, Scazzocchio C (1997). A rapid method for chromatin structure analysis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* 25, 3955-3956.

- Grimaldi B, Coiro P, Filetici P, Berge E, Dobosy JR, Freitag M, Selker EU, Ballario P (2006). The *Neurospora crassa* White collar-1 dependent blue light response require acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Mol. Biol. Cell.* 17, 4576-4583.
- Guadet J, Julien J, Lafay JF, Brygoo Y (1989). Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* 6, 227-242.
- Guhaniyogi J, Brewer G (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265, 11-23.
- Gulledge AA, Roberts AD, Vora H, Patel K, Loraine AE (2012). Mining *Arabidopsis thaliana* RNA-seq data with Integrated Genome Browser reveals stress-induced alternative splicing of the putative splicing regulator SR45a. *Am. J. Bot.* 99, 219-231.
- Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, et al. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458, 223-227.
- Hallegger M, Llorian M, Smith CW (2010). Alternative splicing: Global insights. *FEBS J.* 277, 856-866.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 177-183.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN (1995). Dictionary of the fungi, 8th, 10 ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Hedtke M, Rauscher S, Rohrig J, Rodríguez-Romero J, Yu Z, Fischer R (2015). Light-dependent gene activation in *Aspergillus nidulans* is strictly dependent on phytochrome and involves the interplay of phytochrome and white collar-regulated histone H3 acetylation. *Mol. Microbiol.* 97, 733-745.
- Jin JM, Lee J, Lee YW (2010). Characterization of carotenoid biosynthetic genes in the ascomycete *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 302, 197-202.
- Johnson EA, Schroeder WA (1996). Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology for improved foods and flavors (ACS symposium series, Vol. 627)*, Chapter 4, 39-50.
- Karmodiya K, Drebs AR, Oulad-Abdelghani M, Kimura H, Tora L (2012). H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics.* 13:424.
- Keller NP, Hohn TM (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 21, 17-29.
- Kim H, Son H, Lee YW (2014). Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*. *J. Appl. Microbiol* 116, 380-389.
- Kistler HC (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopatology* 87, 474-479.
- Lai EC (2003). microRNAs: runts on the genome assert themselves. *Curr. Biol.* 13, 925-936.
- Landrum JT, Bone RA (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch. Biochem. Biophys.* 1, 28-40.

- Lang-Feulner J, Rau W (1975). Redox dyes as artificial photoreceptors in light-dependent carotenoid synthesis. *Photochem. Photobiol.* 21, 179-183.
- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S et al. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.* 13, 1192-1200.
- Levin JZ, Yassour M, Adiconis X, Nusbaum C, Thompson DA, et al. (2010). Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nat. Methods* 7, 709-715.
- Li D, Roberts R (2001). WD-repeat proteins: structure characteristics, biological, function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 2085-2097
- Li L, Chang SS, Liu Y (2010). RNA interference pathways in filamentous fungi. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3849-3863.
- Li W, Li C, Li S, Peng M (2017). Long noncoding RNAs that respond to *Fusarium oxysporum* infection in "Cavendish" banana (*Musa acuminata*). *Sci. Rep.* 7, 16939.
- Licatalosi DD, Darnell RB (2010). RNA processing and its regulation: Global insights into biological networks. *Nat. Rev. Genet.* 11, 75-87.
- Linnemannstöns P, Prado MM, Fernández-Martín R, Tudzynski B, Avalos J (2002). A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes *carB* and *carRA*. *Mol. Genet. Genomics* 267, 593-602.
- Lister R, Gregory BD, Ecker JR (2009). Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 107-118.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lorca-Pascual JM, Murcia-Flores L, Garre V, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM (2004). The RING-finger domain of the fungal repressor *crpA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Mol. Microbiol.* 52, 1463-1474.
- Ma L, Bajic VB, Zhang Z (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol* 10, 925-933.
- Martens JA, Laprade L, Winston F (2004). Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature* 429, 571-574.
- McKinlay A, Araya CL, Fields S (2011). Genome-wide analysis of nascent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3* 1, 549-558.
- Mende K, Homann V, Tudzynski B (1997). The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: Isolation and expression. *Mol. Gen. Genet.* 255, 96-105.
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS (2009). Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10, 155-159.
- Mercer TR, Mattick JS (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 300-307.

- Metha BJ, Obratsova IN, Cerdá-Olmedo E (2003). Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of beta-carotene and lycopene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4043-4048.
- Metzker ML (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31-46.
- Michán S, Lledías F, Hansberg W (2003). Asexual development is increased in *Neurospora crassa* *cat-3*-null mutant strains. *Eukaryot Cell.* 2, 798-808.
- Michielse CB, Rep M (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant. Pathol.* 10, 311-324.
- Miller MW, Yoneyama M, Soneda M (1976). *Phaffia*. The yeasts. A taxonomic study (5th Edition, 2011), Chapter 152
- Mlynarczyk SK, Panning B (2000). X inactivation: Tsix and Xist as yin and yang. *Curr. Biol* 10, 899-903.
- Moeller SM, Jacques PF, Blumberg JB (2000). The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 522S-527S.
- Moran NA, Jarvik T (2010). Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science.* 328, 624-627.
- Mortazavi A, Willian BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621-628.
- Moss MO, Smith JE (1984). The applied mycology of *Fusarium*. *Cambridge, British Mycological Society* .
- Murcia-Flores L, Lorca-Pascual JM, Garre V, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM (2007). Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 15394-15403.
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320, 1344-1349.
- Namitha KK, Negi PS (2010). Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 728-760.
- Navarro E, Lorca-Pascual JM, Quiles-Rosillo MD, Nicolás FE, Garre V, et al. (2001). A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol. Genet. Genom.* 266, 463-470.
- Navarro E, Ruiz-Pérez VL, Torres-Martínez S (2000). Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* 267, 800-807.
- Ojima K, Breitenbach J, Visser H, Setoguchi Y, Tabata K, Hoshino T, van den Berg J, Sandmann G (2006). Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol. Genet. Genomics* 275, 148-158.

- Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, et al. (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 420, 563-573.
- Ootaki T, Crafts-Lighty A, Delbrück M, Hsu WJ (1973). Complementation between mutants of *Phycomyces* deficient with respect to carotenogenesis. *Mol. Gen. Genet.* 121, 57-70.
- Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel A, Roncero MI, Mayayo E, Pietro AD (2004). *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect Immun* 72, 1760-1766.
- Ozsolak F, Milos PM (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.* 12, 87-98.
- Pang KC, Frith MC, Mattick JS (2006). Rapid evolution of noncoding RNAs: Lack of conservation does not mean lack of function. *Trends. Genet.* 22, 1-15.
- Pérez-Lluch S, Guigó R, Corominas M (2015). Active transcription without histone modifications. *Nat. Genet.* 47, 1158-1167.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pietro AD, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MI (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol* 4: 315-325.
- Pillai RS (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?. *RNA society* 11, 1753-1756.
- Polaino S, Herrador MM, Cerdá-Olmedo E, Barrero AF (2010). Splitting of beta-carotene in the sexual interaction of *Phycomyces*. *Org. Biomol.Chem.* 8, 4229-4231.
- Ponting CP, Oliver PL, Reik W (2009). Evolution and functions of long non coding RNAs. *Cell* 136, 629-641.
- Porter JW, Lincoln RE (1950) Lycopersicon selections containing a high content of carotenes and colorless polyenes; the mechanism of carotene biosynthesis. *Arch. Biochem.* 27, 390-403.
- Powell WA, Kistler HC (1990). In vivo rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. *J. Bacteriol.* 172, 3163-3171.
- Prado MM, Prado-Cabrero A, Fernández-Martín R, Avalos J (2004). A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Curr. Genet.* 46, 47-58.
- Prado-Cabrero A, Estrada AF, Al-Babili S, Avalos J (2007a). Identification and biochemical characterization of a novel carotenoid oxygenase: Elucidation of the cleavage step in the *Fusarium* carotenoid pathway. *Mol Microbiol.* 64: 448-460.
- Prado-Cabrero A, Schaub P, Díaz-Sánchez V, Estrada AF, Al-Babili S, Avalos J (2009). Deviation of the neurosporaxanthin pathway towards beta-carotene biosynthesis in *Fusarium fujikuroi* by a point mutation in the phytoene desaturase gene. *FEBS J.* 276, 4582-4597.
- Prado-Cabrero A, Scherzinger D, Avalos J, Al-Babili S (2007b). Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell* 6, 650-657.

- Proietto M, Bianchi MM, Ballario P, Brenna A (2015). Epigenetic and posttranslational modifications in light signal transduction and the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 15347–15383.
- Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N et al. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids. Res.* 40, D290-D301.
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemanse MA, Pouwels PH, van den Hondel CA (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the Hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*. 56, 117-124.
- Quan M, Chen J, Zhang D (2015). Exploring the secrets of long noncoding RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 5467-5496.
- Quiles-Rosillo MD, Torres-Martínez S, Garre V (2003). *cigA* a light-inducible gene involved in vegetative growth in *Mucor circinelloides* is regulated by the carotenogenic repressor *crgA*. *Fungal Genet. Biol.* 38, 122-132.
- Rademacher W (1997). Gibberellins. In: Anke T (ed). *Fungal Biotechnology*, pp 193-205.
- Rau W (1967). Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. II. Ersatz der Lichtinduktion durch Mercuribenzoat. *Pflanze* 74, 263-277.
- Rau W (1971). Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. VII. Reversible Unterbrechung der Reaktionskette durch Cycloheximid und anaerobe Bedingungen. *Pflanze* 101, 251-264.
- Rau W, Feuser B, Rau-Hund A (1967). Substitution of p-chloro- or p-hydroxymercuribenzoate for light in carotenoid synthesis by *Fusarium aquaeductuum*. *Biochim. Biophys. Acta* 136, 589-590.
- Ravasi T, Suzuki H, Pang KC, Katayama S, Furuno M, et al. (2006). Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome. *Genome Res.* 16, 11-19.
- Reverberi M, Ricelli A, Zjalic S, Fabbri AA, Fanelli C (2010). Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 899-911.
- Rinn JL (2014). lncRNAs: Linking RNA to chromatin. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6, a018614.
- Rodríguez-Ortiz R (2012). Análisis genético y molecular del fenotipo *carS* en *Fusarium*. Ph.D. Thesis, Universidad de Sevilla, Seville, Spain.
- Rodríguez-Ortiz R, Limón MC, Avalos J (2013). Functional analysis of the *carS* gene of *Fusarium fujikuroi*. *Mol. Genet. Genom.* 288, 157-153.
- Rodríguez-Ortiz R, Michielse C, Rep M, Limón MC, Avalos J (2012). Genetic basis of carotenoid overproduction in *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 684-696.
- Rodríguez-Ortiz, Limón MC, Avalos J (2009). Regulation of carotenogenesis and secondary metabolism by nitrogen in wild-type *Fusarium fujikuroi* and carotenoid-overproducing mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 405-413.
- Rodríguez-Sáiz M, Paz B, De La Fuente JL, López-Nieto MJ, Cabri W, Barredo JL (2004). *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5589-5594.

- Rohlfs M, Churchill AC (2011). Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genet. Biol.* 48, 23-34.
- Roncero MI, Cerdá-Olmedo E (1982). Genetics of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr. Genet.* 5, 5-8.
- Rose MD, Winston F, Hieter P (1990). Methods in yeast Genetics. A laboratory Course Manual. pp 198 Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*, New York.
- Rother S, Meister G (2011). Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie* 93, 1905-1915.
- Ruger-Herreros M (2016). Participación de la Proteína CarS en la Regulación de la Carotenogénesis y el Estrés en *Fusarium fujikuroi*. Ph.D. Thesis, Universidad de Sevilla, Seville, Spain.
- Ruiz-Hidalgo MJ, Benito EP, Sandmann G, Eslava AP (1997). The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol Gen. Genet.* 253, 734-744.
- Ruiz-Roldán MC, Garre V, Guarro J, Mariné M, Roncero MI (2008). Role of the White collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukariot Cell* 7, 1227-1230.
- Saelices L, Youssar L, Holdermann I, Al-Babili S, Avalos J (2007). Identification of the gene responsible for torulene cleavage in the *Neurospora* carotenoid pathway. *Mol. Genet. Genomics* 278, 527-537.
- Sakaki H, Kaneno H, Sumiya Y, Tsushima M, Miki W, Kishimoto N, Fujita T, et al. (2002). A new carotenoid glycosyl ester isolated from a marine microorganism, *Fusarium* strain T-1 J. *Nat. Prod.* 65, 1683-1684.
- Sambrook J (1989). Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2ed. Book1. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, EE.UU, 1.82-1.84
- Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, EE.UU.
- Sandmann G (1993). Photoregulation of carotenoid biosynthesis in mutants of *Neurospora crassa*: Activities of enzymes involved in the synthesis and conversion of phytoene. *Zeitschrift Nat. Section C. J. Biosci* 48, 570–574.
- Sandmann G, Misawa N (2002). Fungal carotenoids. In *The Mycota X Industrial Applications* (Osiewacz HD ed.), *Springer*, Berlin Heidelberg. pp. 247-262.
- Sandmann G, Misawa N, Wiedemann M, Vittorioso P, Carattoli A, morelli G, Macino G (1993). Functional identification of *al-3* from *Neurospora crassa* as the gene for geranylgeranyl pyrophosphate synthase by complementation with *crt* genes, in vitro characterization of the gene product and mutant analysis. *J. Photochem. Photobiol. B* 18, 5054-5070.
- Schenk PM, Carvalhais LC, Kazan K (2012). Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help?. *Trends Biotechnol.* 30, 177-184.
- Schmidhauser TJ, Lauter FR, Russo VE, Yanofsky C (1990). Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell Biol.* 10, 5064-5070.

- Schmidhauser TJ, Lauter FR, Schumacher M, Zhou W, Russo VE, Yanofsky C (1994). Characterization of *al-2*, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J. Biol. Chem.* 269, 12060-12066.
- Schroeder A, Mueller O, Socker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7, 3.
- Schroeder WA, Johnson EA (1995). Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* 270, 18374-18379.
- Sies H, Stahl W (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1315S-1321S.
- Silva F, Navarro E, Peñaranda A, Murcia-Flores L, Torres-Martínez S, Garre V (2008). A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a White Collar-1-like activator. *Mol. Microbiol.* 70, 1026-1036.
- Smith TF (2008). Diversity of WD-repeat proteins. *Subcell. Biochem.* 48, 20-30.
- Snodderly DM (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1448S-1461S.
- Sokolovsky VY, Lauter FR, Müller-Röber B, Ricci M, Schmidhauser TJ, Russo VEA (1992). Nitrogen regulation of blue light-inducible genes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2045-2049.
- Solomon MJ, Larsen PL, Varshavsky A (1988). Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* 53, 937-947.
- Solomon MJ, Varshavsky A (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6470-6474.
- Stahl W, Sies H (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15, 291-296.
- Stephen DS, Jones C, Schofield JP (1990). A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 18, 7463-7464.
- Strobel I, Breitenbach J, Scheckhuber CQ, Osiewacz HD, Sandmann G (2009). Carotenoids and carotenogenic genes in *Podospora anserina*: Engineering of the carotenoid composition extends the life span of the mycelium. *Curr. Genet.* 55, 175-184.
- Studt L, Janevska S, Arndt B, Boedi S, Sulyok M, Humpf HU, Tudzynski B, Strauss J (2017). Lack of the COMPASS component Ccl1 reduces H3K4 trimethylation levels and affects Transcription of secondary metabolite genes in two plant-pathogenic *Fusarium* species. *Front. Microbiol.* 7:2144.
- Studt L, Tudzynski B (2014). Gibberellins and the red pigments bikaverin and fusarubin. In *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*. Springer: New York, NY, USA, 2014; pp. 209-238, ISBN 978-1-4939-1190-5.
- Sui X, Kiser PD, von Lintig J, Palczewski K (2013). Structural basis of carotenoid cleavage: from bacteria to mammals. *Arch. Biochem. Biophys.* 539, 203-213.

- Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS one*, 6, 221800.
- Sutter RP (1975). Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 127-130.
- Telfer A (2005). Too much light? How-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochem. Photobiol. Sci* 4, 950-956.
- Theimer RR, Rau W (1970). Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese V. Aufhebung der Lichtinduktion durch Reduktionsmittel und Ersatz des Lichts durch Wasserstoffperoxid. *Planta. Springer* 92, 129-137.
- Theimer RR, Rau W (1972). Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese VIII. Die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen von Licht und mercuribenzoat. *Planta. Springer* 106, 331-343.
- Thewes S, Prado-Cabrero A, Prado MM, Tudzynski B, Avalos J (2005). Characterization of a gene in the car cluster of *Fusarium fujikuroi* that codes for a protein of the carotenoid oxygenase family. *Mol. Genet. Genomics* 274, 217-228.
- Till P, Mach RL, Mach-Aigner AR (2018a). A current view on long noncoding RNAs in yeast and filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7319-7331.
- Till P, Pucher ME, Mach RL, Mach-Aigner AR (2018b). A long noncoding RNA promotes cellulase expression in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Biofuels* 23, 11:78.
- Torres-Martínez S, Murillo FJ, Cerdá-Olmedo E (1980). Genetics of lycopene cyclization and substrate transfer in $\beta\epsilon\alpha$ -carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Genet. Res.* 36, 299-309.
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR et al. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* 7, 562-578.
- Valadon LRG, Mummery RS (1969). Biosynthesis of neurosporaxanthin. *Microbios* 1A, 3-8.
- Valadon LRG, Osman M, Mummery RS, Jerebzooff-Quintin S, Jerebzooff S (1982). The effect of monochromatic radiation in the range 350 to 750 nm on the carotenogenesis in *Verticillium agaricinum*. *Physiol. Plant.* 56, 199-203.
- van Bakel H, Nislow C, Blencowe BJ, Hughes TR (2010). Most “dark matter” transcripts are associated with known genes. *PLoS Biology* 8: e1000371.
- van Verk MC, Hickman R, Pieterse CM, van Wees SC (2013). RNA-seq: revelation of the messengers. *Trends Plant Sci.* 18, 175-179.
- Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP (1993). Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clin Infect. Dis.* 17 Suppl 2: S487-491.
- Velayos A, Blasco JL, Alvarez MI, Iturriaga EA, Eslava AP (2000). Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* 210, 938-946.

- Verdoes JC, Krubasik KP, Sandmann G, van Ooyen AJ (1999a). Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 453-461.
- Verdoes JC, Misawa N, Van Ooyen AJ (1999b). Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 750-755.
- von Lintig J (2010). Colors with functions: elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 30, 528-535.
- von Lintig J, Hessel S, Isken A, Kiefer C, Lampert JM, Voolstra O, Vogt K (2005). Towards a better understanding of carotenoid metabolism in animals. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 122-131.
- Wagner EJ, Carpenter PB (2013). Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13, 115-126.
- Wang L, Feng Z, Wang X, Wang X, Zang X (2010). DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* 26, 136-138.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009). RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57-63.
- Wapinski O, Chang HY (2011). Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol.* 21, 354-361.
- Ward JA, Ponnala L, Weber CA (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *Am. J. Bot.* 99, 267-276.
- Werner MS, Sullivan MA, Shan RN, Nadadur RD et al. (2017). Chromatin-enriched lncRNAs can act as cell-type specific activators of proximal gene transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 596-603.
- Whitehead J, Pandey GK, Kandori C (2009). Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 936-947.
- Wiemann P, Sieber CM, von Barchen KW, Stüttgen L et al. (2013). Deciphering the cryptic genome: Genome-wide analyses of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites. *PLoS Pathog.* 9, e1003475.
- Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL (2009). Long noncoding RNAs: Functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 23, 1494-1504.
- Yamashita A, Shichino Y, Yamamoto M (2016). The long non-coding RNA world in Yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 147-154.
- Yoshida Y, Hasunuma K (2004). Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 279, 6986-6993.
- Zhao C, Waalwijk C, de Wit PJGM, Tang D, van der Lee, T (2013). RNA-Seq analysis reveals new gene models and alternative splicing in the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics* 14, 21.
- Zhou Q, Su X, Wang A, Xu J, Ning K (2013). QC-Chain: fast and holistic quality control method for next-generation sequencing data. *PLoS One* 8, e60234.

Zhu QH, Stephen S, Taylor J, Helliwell CA, Wang MB (2014). Long noncoding RNAs responsive to *Fusarium oxysporum* infection in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 201, 574-584.

Anexos

Anexo I. Tabla C2.1. Cambio relativo de la expresión de los genes activados por luz (log2).

Gen	Cambio Relativo (CR)	Dominios Conservados
"FOXG_11750"	329,5012208	"Ferritin_2"
"FOXG_12144"	167,5409559	"SQS_PSY"
"FOXG_12143"	165,596687	"Amino_oxidase Amino_oxidase"
"FOXG_12142"	161,5335468	"Bac_rhodopsin"
"FOXG_13071"	130,1489624	"Oxysterol_BP"
"FOXG_16481"	127,9884666	"adh_short adh_short"
"FOXG_09735"	73,30349091	"Oxidored_FMN YadA_stalk"
"FOXG_12145"	70,39592436	"RPE65 PPI_Ypi1"
"FOXG_03802"	65,67215991	"GFA"
"FOXG_03570"	63,63065203	"DNA_photolyase FAD_binding_7"
"FOXG_03254"	60,58505284	"PAS_9"
"FOXG_02361"	54,01469317	"Fasciclin Fasciclin Fasciclin Fasciclin"
"FOXG_08212"	48,9192371	"FAD_binding_3"
"FOXG_02360"	44,14628096	"Zn_clus"
"FOXG_01269"	43,43421324	"KGG KGG KGG KGG KGG KGG"
"FOXG_15293"	42,16079015	"GMC_oxred_N GMC_oxred_C GMC_oxred_N GMC_oxred_C"
"FOXG_02731"	40,55646489	"adh_short adh_short"
"FOXG_02357"	37,74490474	"Catalase Catalase-rel Catalase Catalase-rel"
"FOXG_16836"	37,31619546	"Catalase Catalase-rel"
"FOXG_04625"	36,0838157	"DJ-1_Pfpl"
"FOXG_05310"	35,55128988	""
"FOXG_11729"	34,93085377	""
"FOXG_12863"	34,40771067	"DUF3140"
"FOXG_08913"	33,81731	"NAD_binding_8 Pyr_redox DUF3452"
"FOXG_02358"	30,86521637	"Abhydrolase_5 Abhydrolase_5"
"FOXG_15721"	30,85003027	""
"FOXG_07672"	28,57338395	"RTA1"
"FOXG_09962"	27,81902592	"Aldo_ket_red Dev_Cell_Death Rhabdo_M1"
"FOXG_15936"	27,10806066	"PsbW"
"FOXG_04476"	24,86371557	"Fasciclin DUF4265 Fasciclin"
"FOXG_11695"	24,02242684	"DUF5097 Amidase"
"FOXG_09558"	23,73707064	"2_5_RNA_ligase2"
"FOXG_10652"	23,0389011	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_10608"	22,21573549	"RPE65"
"FOXG_14952"	19,71114939	"PS_Dcarbxylyase"
"FOXG_16988,"	19,15	74017280674 ""
"FOXG_10951"	18,92025988	"OsmC OsmC"
"FOXG_08985"	18,36847564	"Oxysterol_BP NDUF_B8"
"FOXG_03376"	17,64478566	""
"FOXG_11130"	17,0169432	""
"FOXG_03009"	16,58802245	"DUF2823 DUF2823"
"FOXG_03150"	15,80654333	"HhH-GPD TAFII55_N"
"FOXG_11715"	15,76398088	"DUF1772"
"FOXG_02862"	15,29692749	""
"FOXG_10653"	15,17042923	"Rieske Pyr_redox_2 Reductase_C"
"FOXG_15733"	15,02913425	"Caleosin"
"FOXG_09961"	14,86646774	"Glyco_transf_8"
"FOXG_00472"	14,69007646	"adh_short adh_short"
"FOXG_08697"	14,62616868	"Catalase Catalase-rel"
"FOXG_02789"	14,54982605	"HhH-GPD HhH-GPD"
"FOXG_02406"	14,15529588	"XFP_N XFP XFP_C XFP_N XFP XFP_C"
"FOXG_12807"	13,96738464	"DUF4072"
"FOXG_04570"	13,52718743	"FMO-like DAO"
"FOXG_06342"	13,18714179	"Pyrid_ox_like"
"FOXG_02405"	12,99648876	"Catalase Catalase-rel DJ-1_Pfpl Catalase Catalase-rel"
"FOXG_15712"	12,72928958	"ABC_trans_N ABC_tran Pantoate_ligase"
"FOXG_07696"	12,58235441	"Cytochrom_B561 DUF4271"
"FOXG_06162"	12,09995687	""
"FOXG_16837"	12,07164182	"Oxidored_molyb SLBB Mo-co_dimer"
"FOXG_04893"	11,2010339	"DUF3429"
"FOXG_15803"	11,0000639	""
"FOXG_11766"	10,88462652	"NmrA"
"FOXG_04984"	10,63538239	""

"FOXG_02795"	10,10102645	"Molybdop_Fe4S4 Molybdopterin SGT1
"FOXG_02060"	9,939546299	"FAD_binding_7 FAD_binding_7"
"FOXG_05170"	9,885404495	"Con-6 Con-6"
"FOXG_10465"	9,808754793	""
"FOXG_05475,"	9,717	12818153364 ""
"FOXG_04522"	9,663461083	"Hydrophobin_2"
"FOXG_01331"	9,637907802	"ADH_N_2 ADH_zinc_N ADH_N_2 ADH_zinc_N"
"FOXG_11751"	9,495473872	"Hemerythrin Peptidase_S46 UBN2_3 Hemerythrin"
"FOXG_10870"	9,450954226	"NmrA SecA_DEAD NmrA"
"FOXG_14502"	9,443881899	""
"FOXG_04582"	9,136869819	"Cofilin_ADF CheF-arch"
"FOXG_07663"	9,036724874	"DUF1074 Phasin_2 Apolipoprotein TipAS"
"FOXG_09850"	8,941643331	""
"FOXG_05356"	8,915588312	"CsbD CsbD FlgT_M"
"FOXG_02947"	8,773424046	"Chordopox_L2 DUF2611"
"FOXG_12347"	8,721220207	""
"FOXG_15294"	8,594180037	"Catalase Catalase-rel Catalase Catalase-rel"
"FOXG_17387"	8,515315594	"Methyltransf_23"
"FOXG_09507"	8,509769176	""
"FOXG_10120"	8,495447831	""
"FOXG_08317"	8,49303385	"Collagen_mid"
"FOXG_15642"	8,434134333	"adh_short"
"FOXG_14809"	8,426654648	""
"FOXG_01309"	8,37146433	""
"FOXG_12107"	8,171154892	"Thioredoxin"
"FOXG_05101"	8,161532081	"DUF1761"
"FOXG_16486"	8,088599898	"Zn_clus Fungal_trans_2"
"FOXG_13883"	8,076554707	""
"FOXG_07424"	7,990301823	"adh_short"
"FOXG_11015"	7,820712234	"ADH_N ADH_zinc_N ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_09796"	7,698994286	"Dyp_perox"
"FOXG_03307"	7,697553556	"EI24"
"FOXG_09098"	7,624327019	"PALP adh_short"
"FOXG_03444"	7,618093527	"Chal_sti_synt_N Chal_sti_synt_C"
"FOXG_15734"	7,549912896	"Aldo_ket_red HGD-D"
"FOXG_04640"	7,514983831	"Zn_clus"
"FOXG_15372"	7,458109609	"adh_short adh_short"
"FOXG_12392"	7,355227677	"CoA_transf_3 FAD_binding_3"
"FOXG_04660"	7,274812174	""
"FOXG_09754"	7,238144954	""
"FOXG_04352"	7,183764221	""
"FOXG_09957"	7,088743852	"zf-C2HC5 DUF2256 Ecl1"
"FOXG_07629"	7,073332106	"Ank_2"
"FOXG_09966"	7,014012492	"AMP-binding PP-binding Anillin_N NAD_binding_4"
"FOXG_09888"	6,996095583	"Glyco_hydro_43"
"FOXG_00361"	6,990036553	"TspO_MBR TspO_MBR"
"FOXG_12052"	6,958179999	"DUF1689 Ni_hydr_CYTB"
"FOXG_04329"	6,926756697	"PSDC PS_Dcarbxyase Biotin_lipoyl_2"
"FOXG_05153"	6,904466771	"He_PIG He_PIG He_PIG DUF4448 TMEM154"
"FOXG_05157"	6,789569021	""
"FOXG_00142"	6,65689771	"peroxidase peroxidase"
"FOXG_07101"	6,588910819	"PS_Dcarbxyase"
"FOXG_02794"	6,570758871	"MoeA_N MoCF_biosynth MoeA_C MoeA_N MoCF_biosynth"
"FOXG_10458"	6,491266556	"P4Ha_N DUF4449"
"FOXG_08385"	6,470153771	"zf-CHCC Oxidored_FMN"
"FOXG_12044"	6,443747666	"ApbA ApbA_C"
"FOXG_04939"	6,417049002	"DUF1264"
"FOXG_04863"	6,2086517	""
"FOXG_06197"	6,022280892	"SelR"
"FOXG_05414"	5,999365801	""
"FOXG_07792"	5,998409435	"Apolipoprotein DUF883 YtxH"
"FOXG_04569"	5,947815929	"GST_N_3 GST_C"
"FOXG_02219"	5,946702901	"DUF1295 DUF1295"
"FOXG_12352"	5,946373155	"PA_decarbox"
"FOXG_11427"	5,788060493	"Sugar_tr"
"FOXG_02369"	5,788060493	"CHZ"

"FOXG_16901"	5,768874986	"EHN"
"FOXG_12362"	5,767755465	"His_Phos_2"
"FOXG_09276"	5,693398175	"Mito_carr Mito_carr Mito_carr"
"FOXG_06161"	5,689374308	""
"FOXG_09866"	5,688112504	"Oxidored_FMN"
"FOXG_07920"	5,650662409	"CFEM"
"FOXG_01142"	5,640800838	"malic Malic_M malic Malic_M"
"FOXG_14811"	5,631034539	"DUF2967 bZIP_1 Cnn_1N Hormone_6"
"FOXG_04356"	5,600012316	"PAP2"
"FOXG_12279"	5,517558421	"BPD_transp_2 PAP2"
"FOXG_16644"	5,476332334	"Mem_trans"
"FOXG_06292"	5,468973229	"Aconitase Aconitase_C"
"FOXG_11687"	5,457234355	"FMN_dh"
"FOXG_00838"	5,431422153	""
"FOXG_01369"	5,41184305	""
"FOXG_05036"	5,39872975	"DUF3305 DUF1471"
"FOXG_16407"	5,357834433	"MFS_1"
"FOXG_17470"	5,334969414	""
"FOXG_04345"	5,32492055	"Flavin_Reduct"
"FOXG_06019"	5,26666611	"adh_short FlgD_ig"
"FOXG_01769"	5,261448374	""
"FOXG_03326"	5,224996244	"DUF4336 DUF4336"
"FOXG_16911"	5,21598601	""
"FOXG_03562"	5,169877155	"MT0933_antitox"
"FOXG_04143"	5,156670988	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_03143"	5,105350463	""
"FOXG_03788"	5,098772612	""
"FOXG_13856"	5,064079312	"C2 C2"
"FOXG_02809"	5,054190351	"ADH_N ADH_zinc_N_2 ADH_N ADH_zinc_N_2"
"FOXG_04927"	5,012533592	"DUF3292 Pex24p VIR_N Peroxin-22"
"FOXG_05564"	5,005346693	"MBOAT"
"FOXG_14810"	4,998620499	""
"FOXG_12133"	4,995260792	"GST_N GST_C_2"
"FOXG_04045"	4,990761633	"cobW cobW CobW_C PI3K_1B_p101 CobW_C"
"FOXG_05655"	4,987096087	"RTA1 DUF3382 Glycophorin_A"
"FOXG_03358"	4,96595091	""
"FOXG_05896"	4,955360443	"FAD_binding_3"
"FOXG_04186"	4,948015433	"PAS_3 PAS"
"FOXG_09938"	4,945546663	"GATA"
"FOXG_06437"	4,936333956	"Snoal"
"FOXG_16822"	4,904887341	"FAD_binding_3"
"FOXG_08698"	4,87036535	""
"FOXG_00482"	4,856476565	"CAP CAP"
"FOXG_02168"	4,845145532	"ADH_N ADH_zinc_N ADH_zinc_N"
"FOXG_06385"	4,835214862	"Ferrochelataze MP"
"FOXG_13553"	4,831730542	""
"FOXG_05344"	4,809843656	""
"FOXG_01256"	4,78377654	""
"FOXG_00184"	4,783246032	"DUF2417 Abhydrolase_5 DUF2417"
"FOXG_10088"	4,78308026	"PLA2_B PLA2_B"
"FOXG_02423"	4,780395557	"FMO-like FMO-like"
"FOXG_17127"	4,744348539	""
"FOXG_02598"	4,734329112	"Cyt-b5 FMN_dh Cyt-b5 FMN_dh"
"FOXG_12687"	4,706615503	"DUF2183"
"FOXG_13709"	4,689616665	"Fungal_trans_2 DUF935"
"FOXG_09029"	4,639855899	"DJ-1_Pfpl"
"FOXG_09757"	4,637251587	"NmrA"
"FOXG_05118"	4,632850089	"Cyt-b5 Acyl-CoA_dh_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1"
"FOXG_00118"	4,600561649	"SBDS DUF4827 SBDS"
"FOXG_04002"	4,598361857	"His_Phos_2"
"FOXG_12378"	4,582960972	"NPP1 Auxin_BP"
"FOXG_05776"	4,503416775	"Mito_carr Mito_carr Mito_carr"
"FOXG_04971"	4,495993656	"MCU Glyco_trans_4_4 DUF1281"
"FOXG_16987"	4,467507032	"p450"
"FOXG_17025"	4,454520057	"Fungal_trans_2 MIT"
"FOXG_07425"	4,451433489	"Oxidored_FMN Pox_E2-like"

"FOXG_11021"	4,437385828	""
"FOXG_01229"	4,433358409	"adh_short adh_short"
"FOXG_13464"	4,430225088	"Methyltransf_23"
"FOXG_16799"	4,410065245	""
"FOXG_15711"	4,350345552	""
"FOXG_12351"	4,32895859	""
"FOXG_09028"	4,328838567	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_12750"	4,32245217	"MIP"
"FOXG_00282"	4,320804632	"Glyco_hydro_15 Glyco_hydro_15"
"FOXG_09843"	4,317691003	"Cupin_1 DUF4397 Cupin_1"
"FOXG_14290"	4,312576354	""
"FOXG_04533"	4,276290907	"Glyco_hydro_cc"
"FOXG_01367"	4,25573996	F21 HisKA_7TM DUF2207 Glucos_trans_II PLDc_N DUF3951 PLDc_N"
"FOXG_10189"	4,245457411	"TPP_enzyme_N TPP_enzyme_M TPP_enzyme_C"
"FOXG_16636"	4,242898011	"Fe-ADH"
"FOXG_03779"	4,229303225	""
"FOXG_00475"	4,223151492	"Aminotran_5 Aminotran_5 Aminotran_5"
"FOXG_11714"	4,211838155	"Arylesterase"
"FOXG_17157"	4,203933942	"Fe-ADH"
"FOXG_10078"	4,189679832	""
"FOXG_00906"	4,164981248	""
"FOXG_10251"	4,157798954	"Ish1 Ish1 Ish1 Ish1 Slx4 Ish1 Ish1 Thymopoietin HeH Ish1 Ish1"
"FOXG_03003"	4,147810547	"MFS_1 MFS_1"
"FOXG_11697"	4,138104276	""
"FOXG_14921"	4,130338437	"HSP20 HSP20"
"CYC1" 4.116	4,876012996	""
"FOXG_12850"	4,111514737	""
"FOXG_16632"	4,111201262	"adh_short adh_short"
"FOXG_03770"	4,092464778	"Oxidored_molyb Mo-co_dimer Cyt-b5 FAD_binding_6"
"FOXG_15658"	4,082095686	"
"FOXG_04155"	4,080398343	"PLA2_B PTS_IIA DUF2229 THOC7"
"FOXG_06401"	4,029106667	"PMI_typeI Hanta_G1"
"FOXG_12025"	4,024891799	"Ribonuclease"
"FOXG_12374"	4,023608677	"NAD_binding_8 FAD_binding_3 FAD_binding_3"
"FOXG_08773"	4,021684759	""
"FOXG_11023"	3,996646574	""
"FOXG_11419"	3,990999229	""
"FOXG_15371"	3,967526887	"Rax2 VSP DUF4381"
"FOXG_11570"	3,960987092	"Inhibitor_I78"
"FOXG_03360"	3,94914407	"Thaumatoin"
"FOXG_01466"	3,944274612	"Frag1 EMP70 SUR7 DUF3995 Frag1"
"FOXG_06414"	3,928558381	"NACHT_N"
"FOXG_01103"	3,900421398	"Hemerythrin Hemerythrin"
"FOXG_09571"	3,899799628	"Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C Fn3-like"
"FOXG_01430"	3,889271637	""
"FOXG_03637"	3,862727755	"Caleosin"
"FOXG_14596"	3,860720198	"Polyketide_cyc2"
"FOXG_15694"	3,855558879	"Methyltransf_11 GutM"
"FOXG_01544"	3,831926795	"FAD_binding_2 Succ_DH_flav_C DUF600 FAD_binding_2"
"FOXG_06067"	3,821899919	"Abhydrolase_5"
"FOXG_05704"	3,779223917	"DUF4440"
"FOXG_11985"	3,768185532	"NAD_binding_2 6PGD"
"FOXG_10340"	3,752910799	"SPG48 DUF445 DUF4449"
"FOXG_07655"	3,749998452	"GFA Rpr2"
"FOXG_00233"	3,74586784	"HSP20 DDE_Tnp_1_2 HSP20 HSP20"
"FOXG_05156"	3,736428719	"DUF2070 ATP-synt DUF4476"
"FOXG_10813"	3,724301834	"MFS_1"
"FOXG_09278"	3,720637922	"Fer2_3 Fer4_17"
"FOXG_10044"	3,704965221	"Oxidored_FMN"
"FOXG_00559"	3,687722251	"Pil1 Pil1"
"FOXG_05672"	3,651375398	""
"FOXG_17330"	3,650590891	""
"snR75" 3.65	3,059089094	""
"FOXG_05847"	3,646468673	""
"SNORD18" 3.	3,642351110	""
"FOXG_10479"	3,638238197	""

"FOXG_09097"	3,630126945	"ComA DUF4032"
"FOXG_04881"	3,612631243	"AP_endonuc_2 DUF2726"
"FOXG_12918"	3,611329353	"DUF1479"
"FOXG_03445"	3,610703612	"p450"
"FOXG_02465"	3,607351485	"NmrA NmrA"
"FOXG_13044"	3,606051498	"HSP20 HSP20"
"FOXG_02205"	3,605551628	"SnoaL_2"
"FOXG_09565"	3,604252289	""
"FOXG_00558"	3,596889901	"SelP_N"
"FOXG_15360"	3,587478038	"Sugar_tr Sugar_tr"
"FOXG_16991"	3,586980743	"3HCDH_N 3HCDH SGL"
"FOXG_13027"	3,58635922	""
"FOXG_04070"	3,582781346	"adh_short"
"FOXG_11418"	3,557293473	"DUF4604 XAP5 Glucokinase"
"FOXG_13765"	3,547099992	"HisKA HATPase_c Response_reg"
"U2" 3.54144	3,957354678	
"U2" 3.54144	3,957354678	
"FOXG_09065"	3,533382662	"RhoGAP Fez1 PKcGMP_CC"
"FOXG_10778"	3,521743898	"Sugar_tr"
"FOXG_08749"	3,505839622	""
"FOXG_00332"	3,487758142	"ABM"
"FOXG_03045"	3,485631364	"DMSP_lyase"
"FOXG_09418"	3,462490229	"Clp_N Clp_N AAA IncA Mod_r V_ATPase_I ESM4"
"FOXG_00982"	3,461410391	"Romo1 HIG_1_N HIG_1_N"
"PHR" 3.4557	3,048430277	
"FOXG_11420"	3,417615274	"FMN_bind_2"
"FOXG_07679"	3,417544208	"EF-hand_1 MS_channel DUF2648"
"FOXG_16562"	3,414442408	"Lactamase_B"
"FOXG_12721"	3,413472194	"Cyt-b5 Acyl-CoA_dh_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1"
"FOXG_04047"	3,392832012	"VIT1"
"FOXG_03713"	3,387896967	"Aconitase Aconitase_C"
"FOXG_16833"	3,377228982	"SKI"
"FOXG_02432"	3,341301108	"Oxidored_FMN RST Oxidored_FMN"
"FOXG_07926"	3,322248525	"DUF1289"
"FOXG_01973"	3,319601352	""
"FOXG_09346"	3,319440288	"Aminotran_3"
"FOXG_04328"	3,312544878	"GST_N Pox_13 GST_C_2"
"FOXG_15375"	3,304861929	""
"FOXG_12101"	3,304839022	"FMN_dh"
"FOXG_08374"	3,302320168	"NAD_binding_10 DHHA1"
"FOXG_08225"	3,300077716	"HIRAN SNF2_N zf-C3HC4_3 Helicase_C"
"FOXG_03314"	3,292925791	"adh_short"
"FOXG_04253"	3,291761931	"CMD"
"FOXG_03169"	3,287475175	""
"FOXG_00579"	3,284924017	"DUF987"
"FOXG_00795"	3,274398702	"HSP70 HSP70"
"FOXG_12854"	3,25825609	"ADH_N_2 ADH_zinc_N"
"FOXG_13631"	3,257736687	""
"FOXG_17161"	3,253900193	""
"FOXG_12010"	3,250676524	"Hexokinase_1 PTPS Hexokinase_2"
"FOXG_03980"	3,244486133	""
"FOXG_05841"	3,229162404	"ADH_N ADH_zinc_N Glyco_trans_4_2"
"FOXG_14957"	3,225940882	""
"FOXG_09549"	3,215448538	""
"FOXG_16798"	3,193769069	"Metallophos"
"FOXG_09234"	3,193459159	"Fer4_12 Radical_SAM"
"FOXG_07862"	3,191401233	"Heme_oxygenase"
"FOXG_02069"	3,189410954	""
"FOXG_03474"	3,187377729	"SARAF DUF3984"
"FOXG_02440"	3,169708126	"zf-RING_2 c-SKI_SMAD_bind"
"FOXG_02460"	3,168016831	"Pex14_N Choline_transpo Choline_transpo"
"FOXG_04372"	3,158676086	"NmrA Ish1"
"FOXG_05035"	3,152660895	"CECR6_TM121"
"FOXG_13684"	3,138510423	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_10790"	3,138053612	""
"FOXG_17534"	3,135944442	"Sugar_tr"

"FOXG_15359"	3,116377492	"FMN_bind_2 FMN_bind_2"
"FOXG_04451"	3,105229718	"Abhydrolase_1 SPARC_Ca_bdg NGF Abhydrolase_4"
"FOXG_15619"	3,103874014	""
"FOXG_12301"	3,079188098	"Abhydrolase_6"
"FOXG_05525"	3,07829181	"FUSC_2"
"FOXG_09803"	3,06944964	"Sulfotransfer_3"
"FOAF2" 3.06	3,12693755	
"FOXG_05659"	3,060484369	"IDO"
"FOXG_11019"	3,060123758	"DUF3659
"FOXG_03147"	3,059890445	"adh_short adh_short"
"FOXG_03456"	3,058766545	"RRM_1"
"FOXG_13182"	3,058172954	"GFO_IDH_MocA AAA_33 GFO_IDH_MocA_C"
"FOXG_00119"	3,055566755	""
"FOXG_07109"	3,054296245	"HSP20 HSP20"
"FOXG_10478"	3,043644794	"Prok-RING_2"
"FOXG_03739"	3,043243978	"Exo_endo_phos"
"FOXG_00456"	3,036375046	"Sacchrp_dh_NADP CbiJ Sacchrp_dh_NADP"
"FOXG_00087"	3,034334217	"Integrin_B_tail zf-H2C2_2"
"FOXG_15370"	3,034250088	"SMP SMP SMP SMP"
"FOXG_16830"	3,033913598	"NS3_envE"
"FOXG_03999"	3,033913598	""
"FOXG_15477"	3,024108705	"RDD"
"FOXG_17194"	3,019437896	"DUF4366 SR-25"
"FOXG_12009"	3,00982582	""
"FOXG_12194"	3,000493907	"Epimerase"
"FOXG_09573"	2,992020376	"Snoal"
"FOXG_06081"	2,986426054	"DUF1399"
"FOXG_03826"	2,971661935	"DLH"
"FOXG_10320"	2,971167624	"SQS_PSY"
"FOXG_12136"	2,968141765	""
"FOXG_15398"	2,965612292	"MFS_1 DUF1049 MFS_1"
"FOXG_05311"	2,96380391	"polyprenyl_synt"
"FOXG_03627,	2,963	08497432226 ""
"FOXG_02800"	2,956499432	"Methyltransf_7 Methyltransf_7"
"FOXG_08700"	2,912867343	"Glyco_transf_20 Trehalose_PPase"
"FOXG_09905"	2,898888813	"ACT_3 TIR ACT_7"
"FOXG_03643"	2,897121119	"Peroxidase_2 Peroxidase_2"
"FOXG_03437"	2,897101037	"ABC1 ABC1"
"FOXG_14551"	2,894712363	"AMP-binding AIRS_C AMP-binding AMP-binding_C"
"FOXG_11299"	2,892465998	WW WW"
"FOXG_16510"	2,891123024	""
"FOXG_00878"	2,885597343	""
"FOXG_03504"	2,885217341	""
"FOXG_13757"	2,881400097	"Sod_Fe_N Sod_Fe_C"
"FOXG_13212"	2,879263849	"EHN"
"FOXG_06139"	2,878066645	Rsm22"
"FOXG_09552"	2,868805183	"DctQ Ank_4 Ank_2 Ank_2 DUF866 Ank Ank_4"
"FOXG_15720"	2,866598793	"DAO IKI3 Rieske"
"FOXG_01465"	2,852031666	"DUF3812 DUF3812"
"FOXG_14289"	2,842420502	"Glyco_transf_28"
"FOXG_16912"	2,841474956	"ArAE_2_N FUSC_2 ArAE_2"
"FOXG_13626"	2,840962917	"DUF1295 DUF2062"
"U4" 2.83844	2,345148979	
"FOXG_00305"	2,837577901	"DnaJ DUF456 Gly-zipper_OmpA DnaJ"
"FOXG_06399"	2,83250794	"Cyt-b5 FMN_dh"
"FOXG_01484"	2,821964815	""
"U1" 2.82167	2,142442392	
"FOXG_09551"	2,817684343	"Acetyltransf_1"
"FOXG_16582"	2,817098483	"NtCtMGAM_N Gal_mutarotas_2 Glyco_hydro_31"
"FOXG_01881"	2,814268543	"DAO DAO"
"FOXG_16927"	2,804415279	"LIP"
"FOXG_08659"	2,797988436	"PIP5K"
"FOXG_16428"	2,797639363	""
"FOXG_12124"	2,796398565	""
"FOXG_13019"	2,791556972	"Glyoxalase"
"FOXG_09238"	2,780337462	"DinB_2 Gyrl-like FGE-sulfatase"

"FOXG_04016"	2,778603538	"AltA1"
"FOXG_01074"	2,773542822	"CybS LrgB CybS"
"FOXG_09239"	2,765422669	"Methyltransf_25"
"FOXG_11380"	2,765192658	"ADH_N D-ser_dehydrat ADH_zinc_N"
"FOXG_11037"	2,763793831	"DUF2416"
"FOXG_01570"	2,763525644	"Fes1 Atx10homo_assoc HEAT_2"
"FOXG_10437"	2,761515069	"Pyr_redox_2 DUF1950 EF-hand_1"
"FOXG_03603"	2,760787793	""
"FOXG_02416"	2,756160685	""
"snoZ196" 2.	2,756160685	
"FOXG_02354"	2,743219377	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_09544"	2,74230683	"Ysc84"
"FOXG_10108"	2,73748299	""
"FOXG_03745"	2,726632	"Fungal_trans"
"FOXG_07868"	2,722156478	"GSHPx DUF4174"
"FOXG_02337"	2,72162821	"Peptidase_M20 M20_dimer M20_dimer"
"FOXG_08743"	2,720081729	"DUF2207 Asp4 Cation_efflux ZT_dimer"
"FOXG_12856"	2,715692253	"Sugar_tr Trp_oprn_chp"
"FOXG_12102"	2,712907767	"Tannase"
"FOXG_05211"	2,710896438	"Cyt-b5 Nuclease_act"
"FOXG_03579"	2,703690479	"Zn_clus"
"FOXG_16485"	2,703184531	"DUF2306"
"FOXG_07000"	2,703015903	"ABC_tran ABC_tran_Xtn ABC_tran"
"FOXG_03104"	2,69708315	"FAD_binding_4 ALO"
"FOXG_15358"	2,696615822	"Acetyltransf_1 ABM Acetyltransf_1"
"FOXG_02247"	2,696447603	""
"FOXG_17520"	2,692544148	"Acyl-CoA_dh_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1"
"FOXG_10300"	2,691816378	"CAP"
"FOXG_11426"	2,688143211	"GFA"
"FOXG_15292"	2,676003495	"ThuA DUF2194 Lact_bio_phlase ThuA"
"NAT3" 2.672	2,944718026	
"FOXG_09157"	2,665174509	"adh_short"
"FOXG_06376"	2,661390114	"Pyridox_oxase_2"
"FOXG_00668"	2,661371666	"GFO_IDH_MocA GFO_IDH_MocA"
"FOXG_10596"	2,658200635	"Fungal_trans_2"
"FOXG_03767"	2,655309445	"Glyoxalase"
"FOXG_13935"	2,652219171	""
"FOXG_01024"	2,651428786	"Na_Ca_ex Rrn6 Na_Ca_ex Na_Ca_ex Na_Ca_ex"
"FOXG_12103"	2,64634288	"adh_short DUF1771 Glyco_transf_4 CAT_RBD"
"FOXG_00455"	2,643281363	""
"FOXG_01354"	2,642731765	"Rhodanese Rhodanese"
"FOXG_02843"	2,642347114	"MFS_1 MFS_1"
"U5" 2.63746	2,143707333	
"FOXG_01332"	2,634592804	"Aa_trans Aa_trans"
"FOXG_01652"	2,634282375	"DUF1236 Lactamase_B BcrAD_BadFG HAGH_C"
"FOXG_15723"	2,621786123	"Methyltransf_12"
"FOXG_16932"	2,617029161	"GAF_3 HisKA HATPase_c"
"FOXG_05801"	2,602557431	"Abhydrolase_4"
"FOXG_05138"	2,599546568	"Pmp3"
"FOXG_12652"	2,596989174	""
"FOXG_00353"	2,593103877	"Mito_carr Tim17 Mito_carr Mito_carr"
"FOXG_01911"	2,592690507	"UPF0047 UPF0047"
"FOXG_07491"	2,591594498	"GST_N_3 GST_C"
"FOXG_01483"	2,590965849	"Pkinase Pkinase"
"FOXG_01827"	2,588363073	"DUF3545 HNNH"
"FOXG_15702"	2,586246881	"Kelch_3 Kelch_4"
"FOXG_10393"	2,586121398	"NmrA"
"FOXG_07233"	2,580230586	"MARVEL"
"FOXG_09579"	2,579962328	""
"FOXG_15697"	2,578746575	"
"FOXG_04346"	2,576548947	"HATPase_c HSP90 LOH1CR12 DUF1676 Cofac_haem_bdg"
"FOXG_10807"	2,575049205	""
"FOXG_11004"	2,565695572	"Ysc84"
"FOXG_00994"	2,565322134	""
"FOXG_08303"	2,563473529	"Anoctamin"
"FOXG_12261"	2,562798409	"PBP"

"FOXG_04044"	2,560010984	""
"FOXG_08185"	2,559514182	""
"FOXG_03908"	2,557067067	"Semialdehyde_dh SPOR"
"FOXG_04997"	2,554834788	"PHO4"
"FOXG_08228"	2,540865485	"Nop53 DUF2370"
"FOXG_09379"	2,540161105	"Glyco_transf_28 UDPGT ATG_C"
"FOXG_13236"	2,539245703	"AAL_decarboxy"
"FOXG_03106"	2,537574186	"SUR7"
"FOXG_01368"	2,536378407	"TOH_N"
"FOXG_12022"	2,53284712	""
"FOXG_01157"	2,525449162	"Bax1-I Bax1-I"
"FOXG_10542"	2,523226995	"TetR_C_12"
"FOXG_09290"	2,523122059	"ATP11"
"FOXG_08338"	2,520936887	"RAP1"
"FOXG_09443"	2,518247357	"DUF2884 Apolipoprotein TCTP"
"FOXG_01223"	2,516641994	"DUF3391"
"FOXG_09419"	2,516171049	""
"FOXG_12892"	2,514828469	"Aconitase Aconitase_C"
"FOXG_13646"	2,51458444	"GST_N_3 GST_C_2"
"FOXG_02578"	2,512737563	"FAD_binding_3 FAD_binding_3 FAD_binding_3"
"FOXG_14186"	2,508108917	"Chromo Chromo"
"FOXG_09119"	2,507987226	"Pkinase"
"FOXG_04988"	2,503141765	"Pyrophosphatase Lipoprotein_X"
"FOXG_06679"	2,501285954	"RNase_H"
"FOXG_06223"	2,499067726	"Pyridox_ox_2"
"FOXG_11198"	2,498669347	"DUF1772 DUF1772"
"FOXG_09493"	2,494775507	"DUF4112"
"FOXG_07841"	2,491146731	"2-Hacid_dh 2-Hacid_dh_C"
"FOXG_04183"	2,484077182	"DEAD Helicase_C DUF1998"
"FOXG_08389"	2,479982603	"DUF4407 TSNAXIP1_N SKA2 Spc7 Filament Phage_Mu_Gam"
"FOXG_00833"	2,477972196	"DUF3628 UDG UDG"
"FOXG_03769"	2,47757718	"Aldo_ket_red"
"FOXG_10107"	2,476512667	""
"FOXG_02217"	2,475414294	""
"FOXG_05177"	2,474230657	"IFRD DUF3776"
"FOXG_02001"	2,470700266	"bZIP_2"
"FOXG_09615"	2,468731608	""
"FOXG_09357"	2,466901309	"DUF3716"
"FOXG_00091"	2,466234528	""
"FOXG_14683"	2,464149864	"Glyco_hydro_65N Glyco_hydro_65m"
"FOXG_07878"	2,463039902	"DnaJ DnaJ_C"
"FOXG_17131"	2,461572105	"Rieske"
"FOXG_11618"	2,459201585	"HIT"
"FOXG_07586"	2,456986618	""
"FOXG_07636"	2,456629003	"PAF-AH_p_II"
"FOXG_08238"	2,455165026	"Flavodoxin_1 Radical_SAM Wyosine_form"
"FOXG_00378"	2,454773646	"AAA Cob_adeno_trans ERM APG6 IncA OEP DUF1640"
"FOXG_11333"	2,450574488	"adh_short adh_short"
"FOXG_00716"	2,446179038	"KIP1"
"FOXG_00147"	2,443162799	"Lipase_3 Lipase_3"
"FOXG_04019"	2,441317612	"Glyco_hydro_61 Glyco_hydro_61"
"FOXG_09887"	2,438594702	"MFS_1 DUF4437 DUF2203 DUF106"
"FOXG_00685"	2,438510188	"CorA TIC20 CorA"
"FOXG_04147"	2,436634736	"Glyco_hydro_127"
"FOXG_16444"	2,436482736	""
"FOXG_12280"	2,434372599	""
"FOXG_05964"	2,433613397	"CIA30"
"FOXG_10144"	2,433461585	""
"FOXG_12015"	2,429315723	"Glyco_hydro_43"
"FOXG_02336"	2,428844284	"Scs3p Scs3p"
"FOXG_06156"	2,426135286	"RTA1"
"FOXG_03944"	2,425008829	"Glyco_hydro_32N Glyco_hydro_32C"
"FOXG_13954"	2,420256579	"zf-C2H2 zf-C2H2 zf-C2H2"
"snoZ13_snr5"	2,241998818	59 ""
"FOXG_09550"	2,418043167	""
"FOXG_07661"	2,414023968	"Haem_degrading"

"FOXG_08650"	2,412418159	""
"FOXG_03589"	2,411799539	"F-box-like LRR_4"
"FOXG_01594"	2,411749387	""
"FOXG_09555"	2,410378985	"CinA"
"FOXG_07808"	2,408174607	"Arginosuc_synth"
"FOXG_00542"	2,405371951	"DUF3237 DUF3237"
"FOXG_09510"	2,40452179	"Mito_carr Mito_carr Mito_carr"
"FOXG_07896"	2,399343975	"Suc_Fer-like"
"FOXG_17533"	2,399260821	"PRK"
"FOXG_12304"	2,396684492	"Fungal_trans_2"
"FOXG_04951"	2,394559028	"Oxidored_FMN"
"FOXG_05716"	2,39036346	"LMBR1 LMBR1"
"FOXG_07891"	2,388044962	""
"FOXG_11565"	2,383133877	""
"FOXG_03685"	2,378265861	"MpPF26 Tetrspannin DUF4293 MARVEL VIT1"
"FOXG_11643"	2,373078788	"Oxidored_FMN"
"FOXG_05207"	2,3721085	"Aconitase DUF521 Aconitase_C"
"FOXG_02466"	2,369413511	""
"FOXG_13647"	2,369068642	"MARVEL Cation_ATPase_C Tetrspannin"
"FOXG_05128"	2,368838757	"Cerato-platanin"
"FOXG_02258"	2,361592427	""
"FOXG_11543"	2,360757739	""
"FOXG_00873"	2,358762233	"XPG_N UIM XPG_I XPG_N XPG_I"
"FOXG_02091"	2,357993923	"NAD_binding_10"
"FOXG_01217"	2,355690492	"Methyltransf_24 Methyltransf_24"
"FOXG_12590"	2,35549456	"Dimer_Tnp_hAT"
"FOXG_03265"	2,35549456	"HMA HMA E1-E2_ATPase Hydrolase"
"FOXG_00796"	2,351872743	""
"FOXG_02799"	2,351057788	"NmrA NmrA"
"FOXG_00120,"	2,349	00535133841 ""
"FOXG_09537"	2,345344742	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_05196"	2,345165925	"Oxidored_q6"
"FOXG_15204"	2,342485309	"Peptidase_M24 DUF1031 Peptidase_M24"
"FOXG_08784"	2,342355418	""
"FOXG_07997"	2,33867275	""
"FOXG_04966"	2,336874083	"NmrA NadA"
"FOXG_09696"	2,327433585	"HET"
"FOXG_10090"	2,32740132	""
"FOXG_03091"	2,326223959	""
"FOXG_12257"	2,325949864	""
"FOXG_11987"	2,325434009	"CFEM DUF308"
"FOXG_13634"	2,321118213	""
"FOXG_02994"	2,319284818	""
"FOXG_07759"	2,318963319	"FRQ"
"FOXG_03925"	2,317629575	"Uso1_p115_C T35SipB DUF812 CutA1"
"FOXG_12307"	2,315606321	""
"FOXG_10599"	2,315253236	"4HBT_2"
"FOXG_06174"	2,314803932	"Glyoxalase Glyoxalase"
"FOXG_10934"	2,313456545	"ADH_N_2 NmrA ADH_zinc_N_2"
"FOXG_03105"	2,309835323	""
"FOXG_09230"	2,309515134	"RSN1_TM PHM7_cyt RSN1_7TM PHM7_ext"
"FOXG_12540"	2,305995983	""
"FOXG_17109"	2,303887067	"zf-Sec23_Sec24"
"FOXG_09775"	2,303743348	""
"FOXG_08593"	2,296441448	"ArAE_2_N ArAE_2_N FUSC_2 ArAE_2"
"FOXG_08699"	2,294309464	"Aminotran_4"
"FOXG_13648"	2,290718213	"His_Phos_1 DUF4336"
"FOXG_14649"	2,290575315	"Fungal_trans_2"
"FOXG_00311"	2,290226046	"Carb_kinase Carb_kinase"
"FOXG_11354"	2,289305502	"DUF775"
"FOXG_05328"	2,286149896	"Herpes_gE DUF3377 RCR"
"FOXG_16614"	2,282460669	"PIF1 PIF1 Herpes_Helicase"
"FOXG_15291"	2,281242791	"Sugar_tr Sugar_tr"
"FOXG_16865"	2,28035747	"DUF4637 DUF1399 Mu-like_Pro"
"FOXG_12591"	2,277687781	"Dimer_Tnp_hAT"
"FOXG_07531"	2,276945879	"Amino_oxidase Amino_oxidase"

"FOXG_11492"	2,273744267	"Glyco_hydro_18"
"FOXG_10634"	2,272704318	""
"FOXG_02000"	2,267071669	"DnaJ DnaJ_C DnaJ_CXXCXGKG HypA DUF2614"
"FOXG_01204"	2,2655008	"BTB"
"FOXG_13242"	2,263005357	"Het-C Zn_dep_PLPC"
"FOXG_11166"	2,262268237	""
"FOXG_07871"	2,260167979	"MARVEL DUF4281"
"FOXG_06330"	2,259807683	"AFG1_ATPase AFG1_ATPase"
"FOXG_15620"	2,259040288	""
"FOXG_06388"	2,258492308	"MFS_1"
"FOXG_04340"	2,257459335	"DUF2427 Ytp1"
"FOXG_00483"	2,256442476	"HypA zf-DNL zinc_ribbon_4 zf-DNL"
"FOXG_07452"	2,251489891	""
"FOXG_01635"	2,251208998	"ABC_tran ABC_tran"
"FOXG_00824"	2,247171138	"Raffinose_syn Raffinose_syn Raffinose_syn Raffinose_syn"
"FOXG_11024"	2,244540301	"WLM WLM"
"FOXG_11072"	2,242643031	"ADH_N ADH_zinc_N ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_01776"	2,240716302	"TPR_11 SET zf-C6H2 SET"
"FOXG_07987"	2,240607584	"Fer2_4 NADH-G_4Fe-4S_3 Molybdopterin"
"FOXG_09698"	2,239629363	"Dioxygenase_N Dioxygenase_C MG1 DUF4198"
"FOXG_12860"	2,236030706	"DUF669 adh_short"
"FOXG_05265"	2,234078687	"Aft1_OSA Aft1_HRA Aft1_HRR bZIP_1"
"FOXG_09855"	2,23084457	"Dioxygenase_N Dioxygenase_C"
"FOXG_14211"	2,22847998	"zf-H2C2_2 zf-H2C2_2 zf-C2HE zf-H2C2_2"
"FOXG_11312"	2,22482213	"FMN_red FMN_red"
"FOXG_06068"	2,224205364	"Bax1-I"
"FOXG_08316"	2,223958705	"Cu_bind_like"
"FOXG_09903"	2,223773729	"4HBT"
"FOXG_04428"	2,218062472	"Cation_ATPase_C RTA1 Frag1 MIG-14_Wnt-bd"
"FOXG_12350"	2,217877987	"p450 p450 p450"
"FOXG_10191"	2,216295117	"HLH"
"FOXG_03182"	2,215127898	"DSBA"
"FOXG_16821"	2,214928304	"TfoX_N"
"FOXG_05885"	2,214114759	"FAD_binding_2 Cyt-b5 BRK"
"FOXG_16800"	2,211844557	"OrfB_Zn_ribbon Zn_clus"
"FOXG_10312"	2,211262043	""
"FOXG_05087"	2,208321158	"DUF3456"
"FOXG_07032"	2,205766382	"PLATZ Ecl1 zf-MYND"
"FOXG_06203"	2,204742243	"DUF3210"
"FOXG_10328"	2,20374913	"ILVD_EDD"
"FOXG_11284"	2,201840554	"FGGY_N FGGY_C FGGY_N FGGY_C"
"FOXG_15479"	2,201672678	"MARVEL MARVEL"
"FOXG_12327"	2,200314883	"Abhydrolase_5"
"FOXG_02349"	2,199339009	"Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C Fn3-like"
"FOXG_02362"	2,194025054	"DUF924 DUF924"
"FOXG_12953"	2,193888187	""
"FOXG_06152"	2,19262638	"DUF745 IFT57 DUF2935 Jnk-SapK_ap_N DUF745"
"FOXG_03037"	2,19224646	"DLH"
"FOXG_17234"	2,192155289	"adh_short"
"FOXG_10049"	2,192033733	""
"FOXG_11417"	2,190560408	"GST_N_3 GST_C_2"
"FOXG_01610"	2,189786171	"Zn_clus Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_05923"	2,18954333	""
"FOXG_14751"	2,182603396	"MFS_1"
"FOXG_07825"	2,179186997	"PhoD"
"FOXG_02028"	2,178567781	"Pmp3 Pmp3"
"FOXG_11274"	2,174388905	"Bac_rhodopsin Bac_rhodopsin"
"FOXG_01464"	2,173725851	"Y_phosphatase3 Y_phosphatase3 Y_phosphatase3C"
"FOXG_07890"	2,171331499	"Peptidase_C97 Thioredoxin PUL"
"FOXG_13595"	2,171241197	"MFS_1 DUF4191"
"FOXG_04043"	2,170428655	"Macoilin bZIP_1 TMF_DNA_bd"
"FOXG_00032"	2,169691611	"DAGAT DAGAT"
"FOXG_04597"	2,169375812	"Glyco_hydro_36N Melibiase Glyco_hydro_36C"
"FOXG_12998"	2,167241613	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_14206"	2,166625791	"Amidase"
"FOXG_07695"	2,166325454	"PAS_3 PAS PAS_3 HisKA HATPase_c Response_reg"

"FOXG_02141"	2,165559782	"GFA zinc_ribbon_2"
"FOXG_09886"	2,164494298	""
"FOXG_05039"	2,163924254	"zf-C2H2 zf-C2H2 PRKG1_interact LMBR1 Tmemb_cc2"
"FOXG_11013"	2,156706713	"CVNH"
"FOXG_13772"	2,154719392	"p450"
"FOXG_08866"	2,154017543	"HisKA HATPase_c"
"FOXG_16859"	2,153524893	"Nitroreductase"
"FOXG_13314"	2,153271147	"Epimerase"
"FOXG_01780"	2,147770735	"MFS_1 MFS_1"
"FOXG_04395"	2,145836269	"ILVD_EDD"
"tRNA-Val" 2	2,145568557	"
"tRNA-Val" 2	2,145568557	"
"FOXG_01974"	2,141111608	"NAD_binding_2 DUF1932 NAD_binding_2 DUF1932"
"FOXG_08295"	2,14008782	"DnaJ DnaJ_C DnaJ_CXXCXGXG Anti-TRAP"
"FOXG_10527"	2,136278887	""
"FOXG_01069"	2,135849511	"SMP_LBD C2 C2 IMUP C2 C2"
"FOXG_00210"	2,131087752	""
"FOXG_03127"	2,128784631	"CBP4 DUF2852"
"FOXG_02422"	2,128578063	""
"FOXG_13675"	2,127722492	"BNR_2"
"FOXG_04472"	2,12750128	"AAA_11 AAA_12 AAA AAA AAA"
"FOXG_15938"	2,127147388	""
"FOXG_08279"	2,126616661	"5-FTHF_cyc-lig"
"FOXG_16931"	2,126262917	"Arf"
"FOXG_06421"	2,122463877	"DUF4366"
"FOXG_17031"	2,121860779	"MCRA"
"FOXG_04970"	2,121007908	"Acetyltransf_8"
"FOXG_08111"	2,120581602	""
"FOXG_10040"	2,120228861	"CFEM DUF4481 Ferric_reduct FAD_binding_8"
"FOXG_01096"	2,117908115	"FMO-like FMO-like"
"FOXG_13370"	2,117365017	""
"FOXG_04529"	2,11661665	""
"FOXG_11502"	2,116499283	"AAR2"
"FOXG_05606"	2,116440602	"4HBT_3"
"FOXG_07591"	2,116059215	""
"FOXG_08503"	2,11582455	"Cpn10 5-FTHF_cyc-lig"
"FOXG_01814"	2,115795218	"NRN1 Erythro_esteras Erythro_esteras"
"FOXG_12821"	2,115340634	"SOG2 Fe-S_biosyn CPT_N"
"FOXG_09305"	2,113962815	"INSIG UPF0139"
"FOXG_10594"	2,113508625	""
"FOXG_04182"	2,111517201	"Na_Ca_ex MIG-14_Wnt-bd Na_Ca_ex DUF1298"
"FOXG_00167"	2,10564175	"CHORD Phycoerythr_ab CHORD CS CHORD CHORD CS"
"FOXG_00017"	2,103730647	"DUF3602 DUF3602 DUF3602 DUF3602"
"FOXG_14856"	2,099709877	"Fungal_trans TGT_C1"
"FOXG_07396"	2,097353439	"Peptidase_C14"
"FOXG_03909"	2,094622123	"PALP adh_short HHH_5 Ribul_P_3_epim"
"FOXG_08653"	2,091604385	"SNO"
"FOXG_01938"	2,087288471	"UvrD-helicase UvrD-helicase"
"FOXG_15768"	2,084859265	"Methyltransf_2 Vmethyltransf"
"FOXG_09976"	2,083949041	"Bul1_N Bul1_C"
"FOXG_08497"	2,082072059	""
"FOXG_08742"	2,07845282	"Rad4"
"FOXG_13201"	2,078265541	"Cupin_1 Cupin_1"
"FOXG_02378"	2,077099028	"Velvet"
"FOXG_16903"	2,076681547	"MFS_1"
"FOXG_01030"	2,07614902	"ECH_1 ECH_1"
"FOXG_08364"	2,073819024	"hGDE_N hDGE_amylase hGDE_central GDE_C"
"FOXG_15014"	2,070357633	"DUF853"
"FOXG_07847"	2,070271531	""
"FOXG_03436"	2,069740648	"Cyto_heme_lyase"
"FOXG_05443"	2,067532489	""
"FOXG_06820"	2,066071239	"2-Hacid_dh 2-Hacid_dh_C"
"FOXG_17616"	2,058209731	"Aminotran_3"
"FOXG_05992"	2,058181198	"Complex1_51K SLBB NADH_4Fe-4S"
"FOXG_10007"	2,057168546	"ICMT"
"FOXG_04338"	2,054931068	""

"FOXG_13089"	2,051956291	""
"FOXG_15680"	2,049198868	"HMMR_N DivIC V-ATPase_G_2 Phasin"
"FOXG_01702"	2,048957415	"RLI Fer4 ABC_tran ABC_tran RLI Fer4 ABC_tran ABC_tran"
"FOXG_00609"	2,047324802	haC ChaC"
"FOXG_08639"	2,04312858	"DUF4149"
"FOXG_03364"	2,03593288	"Metallophos"
"FOXG_09077"	2,035763543	"Sdh_cyt"
"FOXG_06006"	2,034747816	"Complex1_30kDa"
"FOXG_07584"	2,033436586	""
"FOXG_12212"	2,032858785	"DUF3237"
"FOXG_07171"	2,032393845	"DUF2462 Tmemb_cc2 Glyco_hydro_20b DUF2164"
"FOXG_01121"	2,031351639	"Pkinase Pkinase"
"FOXG_06962"	2,030028526	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_10488"	2,029704916	""
"FOXG_04085"	2,029423559	"c-SKI_SMAD_bind Fer4_7"
"FOXG_11215"	2,028481296	"DUF155 LBP_BPI_CETP_C DUF155"
"FOXG_08210"	2,024113234	"HTH_Tnp_Tc5 DDE_1 Het-C"
"FOXG_09235"	2,020230629	""
"FOXG_08983"	2,019586586	"ParA"
"FOXG_17772"	2,019208656	"DUF367"
"FOXG_05969"	2,015936226	"p450"
"FOXG_15774"	2,015475156	"NAD_binding_9 FAD_binding_3"
"FOXG_08264"	2,015265614	"Reticulon"
"FOXG_15722"	2,015251645	"Lustrin_cystein B_lectin"
"FOXG_02188"	2,014441626	"Fungal_trans Fungal_trans"
"FOXG_06318"	2,013994858	"Pkinase"
"FOXG_13504"	2,013715678	"AA_permease_2"
"FOXG_09711"	2,010884194	"DAO"
"FOXG_03997"	2,009630131	"ArsB ArsB"
"FOXG_11641"	2,008947691	""
"FOXG_11545"	2,008808447	"p450"
"FOXG_02461"	2,008126287	"RdRP V-set_2 RdRP RdRP"
"FOXG_10089"	2,007555678	"ADH_N"
"FOXG_09451"	2,007249564	"Pyr_redox_2 Pyr_redox_dim"
"FOXG_05457"	2,007179999	"AFG1_ATPase AFG1_ATPase AFG1_ATPase AFG1_ATPase"
"FOXG_10309"	2,006637477	"DUF3915"
"FOXG_04308"	2,006428853	"Dioxygenase_C"
"FOXG_10380"	2,006053386	"DUF2534 MFS_1"
"FOXG_11014"	2,004982994	"DUF3425 DUF3425"
"FOXG_11406"	2,004857921	"Aldo_ket_red"
"FOXG_13221"	2,003996515	"DIOX_N 2OG-Fell_Oxy"
"FOXG_08251"	2,003788167	""
"FOXG_17129"	2,003246561	"DUF3452 UBN2 Sushi_2"
"FOXG_13814"	2,001705869	""
"FOXG_15638"	2,001539379	"DUF1691 DUF1691"
"FOXG_07093"	2,001511632	"Fungal_trans"
"FOXG_13826"	2,001178697	"DEAD DUF562 DegS Helicase_C Dicer_dimer"

Anexo I. Tabla C2.2. Cambio relativo de la expresión de los genes reprimidos por luz (log2).

Gen	Cambio Relativo (CR)	Dominios Conservados
"FOXG_11931"	0	
"FOXG_11986"	0,040338745	"Pyr_redox_2 GMC_oxred_N PhoPQ_related GMC_oxred_C"
"FOXG_11987"	0,060297416	"CFEM DUF308"
"FOXG_10691"	0,060392784	"MANEC PAN_4 MANEC PAN_4"
"FOXG_02448,"	0.07399	18407271046 ""
"FOXG_09634"	0,085466923	""
"PG5" 0.0862	4,11365E+11	
"FOXG_16516"	0,09430578	"Pec_lyase_C"
"FOXG_04683"	0,097067356	""
"FOXG_13304"	0,100587295	"Peroxidase_2"
"FOXG_11988"	0,107354904	"Peroxidase_2"
"FOXG_13044"	0,111553679	"HSP20 HSP20"
"FOXG_10044"	0,117034842	"Oxidored_FMN"
"FOXG_10384"	0,123737097	""
"FOXG_10692"	0,123868392	"MANEC PAN_4 PAN_4"
"FOXG_09678"	0,124062585	"SRR1 Exo_endo_phos_2"
"FOXG_08903"	0,130830426	"PAN_1 PAN_1 Glyoxal_oxid_N Kelch_6"
"FOXG_07527"	0,133308437	"Glyco_hydro_12"
"FOXG_07425"	0,133389776	"Oxidored_FMN Pox_E2-like"
"FOXG_04319"	0,137857532	"CN_hydrolase"
"FOXG_17702"	0,145077933	"bZIP_1 DUF5094 Exonuc_VII_L IncA DUF972 Shugoshin_N"
"FOXG_17642"	0,150911013	"Acyl_transf_3 Strep_pep"
"FOXG_07395"	0.1524776822	"
"FOXG_10052"	0,153479726	"Glyco_hydro_28"
"FOXG_00405"	0,161921897	"RhgB_N fn3_3 CBM-like RhgB_N fn3_3 CBM-like"
"FOXG_11698"	0,164388354	"Glyco_hydro_61 A2M_N"
"FOXG_17641"	0,165768294	""
"FOXG_09610"	0,166716639	"Alginate_lyase Chorion_1"
"XYL2" 0.168	2,22198E+11	
"FOXG_02513"	0,169555556	"Pec_lyase_C Pec_lyase_C"
"FOXG_11813"	0,169719001	"EHN"
"FOXG_13045"	0,174327249	"AA_permease"
"FOXG_09647"	0,174839129	"Glyco_hydro_61"
"FOXG_17596"	0,180389841	"adh_short"
"FOXG_11958"	0,183749216	""
"FOXG_14564"	0,184897805	"Peptidase_S8 PA fn3_5 FlgD_ig"
"FOXG_15346"	0,186990904	"Glyco_hydro_62 Glyco_hydro_62"
"FOXG_10810"	0,187273672	"DUF2341"
"FOXG_06050"	0,190937185	"NmrA"
"FOXG_16537"	0,197029014	"Cupin_5"
"FOXG_00784"	0,197288668	""
"FOXG_16864"	0,197684272	CoA_transf_3 FAD_binding_3 FAD_binding_3"
"FOXG_13568"	0,209038416	"adh_short CRCB"
"FOXG_16797"	0,209727798	"Amino_oxidase"
"FOXG_13455"	0,211847792	"EthD"
"PRTA" 0.213	4,17443E+11	
"FOXG_03451"	0,215468668	"Epimerase"
"FOXG_13442"	0,216258688	"MFS_1"
"FOXG_00220"	0,219262348	"ADH_N ADH_zinc_N ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_16939"	0,219644153	"p450"
"FOXG_03860"	0,224691897	""
"FOXG_11824"	0,224774456	"PTPS"
"FOXG_16638"	0,227904292	"Asp"
"FOXG_04686"	0,229495855	""
"FOXG_05948"	0,231658255	"Pec_lyase_C"
"FOXG_09111"	0,231884774	450 p450 Thioredoxin"
"FOXG_07632,"	0.23267	3691658391 ""
"FOXG_04765"	0,23445452	"Pectate_lyase_3 Glyco_hydro_28"
"FOXG_11081"	0,235877547	Cellulase Cellulase"
"FOXG_12994"	0,237533023	""
"FOXG_16888"	0,238790939	"zf-C2H2_jaz LRS4 zf-C2H2_2"
"FOXG_14915"	0,240685311	"Pkinase"
"FOXG_15403"	0,243084532	"GFO_IDH_MocA GFO_IDH_MocA"

"FOXG_04682"	0,243298613	"Epimerase Glyco_transf_4 PE-PPE Hira Cna_B"
"FOXG_00994"	0,244243149	""
"FOXG_10361"	0,245735807	"TauD"
"FOXG_13024"	0,251142831	"AMP-binding AMP-binding_C PP-binding Condensation"
"FOXG_04706"	0,257818912	"NmrA"
"FOXG_05153"	0,258432604	"He_PIG He_PIG He_PIG DUF4448 TMEM154"
"FOXG_13000"	0,258828789	"Hydrolase_like"
"FOXG_07109"	0,260257203	"HSP20 HSP20"
"FOXG_11960"	0,262367331	""
"FOXG_11996"	0,263462585	"NmrA"
"FOXG_10662"	0,26446707	""
"FOXG_17168"	0,264769712	""
"FOXG_17007"	0,264938608	"adh_short CENP-C_C DUF867"
"FOXG_10969"	0,266640901	Ribosomal_L37ae"
"FOXG_05883"	0,269478112	""
"FOXG_00378"	0,273330811	"AAA Cob_adeno_trans ERM APG6 IncA OEP DUF1640"
"FOXG_13050"	0,275180472	Aldo_ket_red"
"FOXG_16536"	0,277734826	"dCMP_cyt_deam_1 IlvC"
"FOXG_17699"	0,278958033	"Glyoxalase_2"
"FOXG_15383"	0,280847721	"Choline_kinase Choline_kinase Choline_kinase"
"FOXG_16857"	0,282397652	"FAD_binding_4 BBE"
"FOXG_08998"	0,283948265	Aldedh"
"FOXG_04794"	0,286006532	"HET"
"FOXG_03778"	0,28903578	""
"FOXG_12958"	0,289755911	""
"FOXG_14893"	0,291795593	DUF1348"
"FOXG_15250"	0,29206067	"Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C VWA Fn3-like"
"FOXG_10213"	0,294941349	"ANAPC5 DUF3500"
"FOXG_17524"	0,297600736	"
"FOXG_00148"	0,299232753	"AltA1"
"FOXG_08688"	0,300930033	"GP4"
"FOXG_15183"	0,306865848	"Zn_clus Fungal_trans_2 Zn_clus Fungal_trans_2"
"FOXG_11336"	0,307153132	""
"snR32" 0.30	7,59629E+12	
"FOXG_08375"	0,311421402	"Dicty_CAR Sdh_cyt"
"FOXG_09637"	0,311434354	"Bul1_N Bul1_C"
"FOXG_13089"	0,311676222	""
"FOXG_15303"	0,314255522	"ADC ADC"
"FOXG_16872"	0,315915362	"APH"
"FOXG_09690"	0,316182626	"adh_short"
"FOXG_05733"	0,317918748	"adh_short"
"FOXG_08866"	0,31968656	HisKA HATPase_c"
"FOXG_05995"	0,325540738	"ThrE ThrE_2"
"FOXG_17141"	0,3256897	"Lactonase"
"FOXG_05066"	0,32612343	"Methyltransf_11"
"FOXG_14658"	0,326412905	""
"FOXG_11829"	0,328009613	"Epimerase"
"FOXG_11965"	0,329522755	"p450"
"FOXG_04142"	0,329577578	"ABC_tran ABC_membrane ABC_membrane zf-ISL3 ABC_tran"
"FOXG_11459"	0,332037939	""
"FOXG_11246"	0,332551573	""
"FOXG_11953"	0,332646094	"ABC_tran ABC_membrane ABC_tran"
"FOXG_11685"	0,332839832	"Sua5_yciO_yrdC"
"FOXG_02504"	0,333105251	""
"FOXG_14505"	0,335491937	"Glyco_hydro_61"
"FOXG_14673"	0,337041933	"Peptidase_A4 Peptidase_A4"
"FOXG_15249"	0,337729475	"GTP1_OBG Peptidase_C54 Epimerase Epimerase"
"FOXG_04566"	0,339038261	"GST_N GST_C"
"FOXG_12951"	0,339282753	"adh_short"
"FOXG_17154"	0,339875907	"Amidohydro_1 Ntox43 HTH_Mga"
"FOXG_16544"	0,343563815	AA_permease_2"
"FOXG_17219"	0,343730553	"DAO"
"FOXG_06987"	0,34390214	""
"FOXG_01314"	0,343909292	"Glyco_hydro_88 Glyco_hydro_88"
"FOXG_05449"	0,343983197	"Mucin"
"FOXG_08292"	0,344517698	Cation_efflux BPD_transp_2"

"FOXG_17574"	0,345313825	"Macoilin Apt1"
"FOXG_00382"	0,347277296	""
"FOXG_16980"	0,347790396	"Tyrosinase"
"FOXG_02133"	0,347874781	"Zn_clus Zn_clus"
"FOXG_15242"	0,349113972	"ADH_N ADH_zinc_N ADH_zinc_N"
"FOXG_10935"	0,349222883	"MFS_1 ESSS"
"FOXG_02490"	0,349651597	"Cerato-platanin"
"FOXG_04696"	0,350236173	"PALP adh_short Cofilin_ADF"
"FOXG_17603"	0,350768232	""
"FOXG_04838"	0,353521534	"Cutinase"
"FOXG_13271"	0,355630262	"Amidase"
"FOXG_02583"	0,356719009	""
"FOXG_12175"	0,358859247	""
"FOXG_13496"	0,359339641	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_10110"	0,359618713	"Pyridoxal_deC DUF1541"
"FOXG_16570"	0,360065181	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_11101"	0,360297364	HIP1_clath_bdg Tcp11 Tcp11"
"FOXG_02344"	0,360594676	Acetyltransf_1 Acetyltransf_1"
"FOXG_08511"	0,36062717	"Methyltransf_23"
"FOXG_08999"	0,361202554	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_09945"	0,36642758	""
"FOXG_08711"	0,366491082	"Beta-lactamase B5"
"FOXG_10635"	0,366831644	""
"FOXG_15750"	0,367926629	"Pyr_redox_2"
"FOXG_14598"	0,36904023	""
"FOXG_09604"	0,369454857	"Abhydrolase_6"
"FOXG_16565"	0,369541937	"DUF2746 SinI Ank_4 DUF4959"
"FOXG_03633"	0,369603417	""
"FOXG_13585"	0,372040091	""
"FOXG_08902"	0,373334309	""
"FOXG_17216"	0,373657918	"PALP DAO"
"FOXG_14295"	0,373774486	""
"NIRK" 0.374	78367034915	
"FOXG_01378"	0,375163141	"Dioxygenase_N Dioxygenase_C DUF824 Dioxygenase_N"
"FOXG_08698"	0,37546231	"
"FOXG_03894"	0,377332952	"Fungal_trans"
"FOXG_12208"	0,378343876	""
"FOXG_10983"	0,381638864	"Cyt-b5 FA_desaturase Cyt-b5 FA_desaturase"
"FOXG_13676"	0,381638864	"AAA_13 Fez1 TSNAXIP1_N FliJ"
"FOXG_05663"	0,381861135	""
"FOXG_09987"	0,382539333	"Galactosyl_T"
"FOXG_17024"	0,383157646	"CoA_transf_3"
"FOXG_02457"	0,385128021	"Chitin_bind_3 Serglycin Chitin_bind_3"
"FOXG_15800"	0,38736889	"Zn_clus"
"FOXG_17746"	0,389015623	"HMG_box"
"FOXG_13456"	0,389317743	"Pyr_redox_2"
"FOXG_05061"	0,390130853	"NmrA"
"FOXG_08880"	0,391482575	"SesA YgaB COG2 DUF2420 DASH_Dam1 LAGLIDADG_WhiA"
"FOXG_14630"	0,391737732	"
"FOXG_04097"	0,392194171	""
"FOXG_17635"	0,393809549	"PAP2"
"FOXG_07023"	0,398242749	"HLH"
"FOXG_10988"	0,39869295	"DUF1186 Amidohydro_3 Amidohydro_3"
"FOXG_16631"	0,398820093	dh_short DUF3726"
"FOXG_00969"	0,398844973	""
"FOXG_10089"	0,398980461	"ADH_N"
"FOXG_08692"	0,399514564	"MFS_1"
"FOXG_17692"	0,40033232	""
"FOXG_11585"	0,400648783	"MGC-24 Amnionless DUF4366 DUF1191 PspC HOK_GEF"
"FOXG_04450"	0,401054443	"DSBA"
"FOXG_04146"	0,4014466	"Glyco_hydro_11"
"GAOB" 0.401	7,47235E+11	
"FOXG_08754"	0,40255003	"Consortin_C SARAF PRIMA1 DAG1 RCR DUF4733"
"FOXG_09566"	0,404634153	"Dynein_heavy"
"FOXG_07646"	0,404841755	"CPSase_L_chain CPSase_L_D2 Biotin_carb_C AHS2 AHS1"
"FOXG_03062"	0,404841755	""

"FOXG_11946"	0,405774469	""
"FOXG_12908"	0,405856043	""
"FOXG_13059"	0,406929281	"AMP-binding"
"FOXG_11722"	0,407067515	"IncA Baculo_p24 CAT DUF342 Fib_alpha
"FOXG_17535"	0,409220408	"EF-hand_5 RmID_sub_bind PAD"
"FOXG_17573"	0,409688698	""
"FOXG_01375"	0,411310555	"Aldedh DUF4491 Aldedh"
"FOXG_14853"	0,411781237	"adh_short"
"FOXG_02269"	0,412546887	"DUF4451 DUF4451"
"FOXG_11587"	0,412898763	""
"FOXG_04587"	0,413027572	"DHDPS"
"FOXG_07115"	0,413050476	""
"FOXG_15334"	0,413434303	"MMPL IncA"
"FOXG_16603"	0,414228867	"p450"
"FOXG_14497"	0,414518961	"Glyco_hydro_4 Glyco_hydro_4"
"FOXG_17488"	0,415681371	"FAA_hydrolase Hydrolase_4"
"FOXG_17410"	0,417740811	R_MLE_N MR_MLE_C"
"FOXG_17614"	0,417865339	"AAA H_kinase_N"
"FOXG_17217"	0,41815798	Amidase"
"FOXG_04405"	0,418520443	"Sugar_tr"
"FOXG_13164"	0,419583543	"GMC_oxred_N GMC_oxred_C"
"FOXG_13419"	0,419976352	"DUF3712"
"FOXG_11969"	0,420384097	"p450 SRI p450"
"FOXG_15801"	0,420809739	"Arrestin_C"
"FOXG_13497"	0,424206902	"FAD_binding_3 DUF2001 Phe_hydrox_dim"
"FOXG_17649"	0,424680567	Aldo_ket_red Aldo_ket_red"
"FOXG_16794"	0,42585081	"MFS_1"
"FOXG_17220"	0,426075204	"Aldedh"
"FOXG_14795"	0,427495163	"Methyltransf_3"
"FOXG_06359"	0,427640383	"Glyco_hydro_17"
"FOXG_13353"	0,427664097	"Alpha_L_fucos Fucosidase_C"
"FOXG_02554"	0,427871651	"
"FOXG_10673"	0,429571445	"Helo_like_N DUF2290"
"FOXG_03557"	0,431538147	"MFS_1"
"FOXG_17486"	0,431544129	"Pyr_redox_2 Sigma70_r3 RNase_H2-Ydr279"
"FOXG_11869"	0,432163759	"FAD_binding_3 Amidase"
"FOXG_10676"	0,435052074	"EcKinase"
"FOXG_17124"	0,436102752	"zf-C2H2 zf-C2H2"
"FOXG_08916"	0,436489847	"Snoal_2 FlgD_ig"
"FOXG_12959"	0,436774338	""
"FOXG_08602"	0,437146878	"Cupin_1"
"FOXG_12371"	0,437374192	""
"FOXG_13767"	0,438223878	"adh_short CRISPR_Cas2"
"FOXG_05790"	0,440071546	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_04743"	0,440395002	"Fungal_trans"
"FOXG_03526"	0,441299495	"FAD_binding_3 FAD_binding_3"
"FOXG_01278"	0,441776934	"GMC_oxred_N GMC_oxred_C GMC_oxred_N GMC_oxred_C"
"FOXG_16873"	0,441783058	"adh_short"
"FOXG_16940"	0,442021975	"
"FOXG_11013"	0,442218106	CVNH"
"FOXG_05419"	0,44231927	""
"FOXG_13006"	0,442365261	"HAD_2"
"FOXG_02686"	0,442457258	"THF_DHG_CYH THF_DHG_CYH"
"FOXG_06363"	0,44457231	""
"FOXG_11983"	0,445432892	"ABC_membrane ABC_tran"
"FOXG_12954"	0,44557494	"NmrA Tubulin_2"
"FOXG_04523"	0,448851462	"Cupin_1"
"FOXG_15654"	0,449031948	""
"FOXG_01934"	0,449396253	Imm17"
"FOXG_01538"	0,449405598	"CpcD"
"FOXG_15660"	0,449598772	"DUF2730"
"FOXG_13396"	0,450047755	""
"FOXG_16490"	0,450765811	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_03720"	0,451278515	""
"FOXG_10212"	0,451519437	"adh_short"
"FOXG_17663"	0,452242976	"ADH_N ADH_zinc_N"

"FOXG_16918"	0,452581651	"PALP"
"FOXG_07057"	0,453024192	"Sulfatase"
"FOXG_07376"	0,453184367	"ECH_1"
"FOXG_12391"	0,453338314	PP2C_2 Flagellin_N"
"FOXG_15356"	0,453533178	"TauD Ax_dynein_light TauD"
"FOXG_16568"	0,453800467	"AMP-binding AMP-binding_C"
"FOXG_11970"	0,454792384	"AMP-binding AMP-binding_C"
"FOXG_08316"	0,454927957	"Cu_bind_like"
"FOXG_16937"	0,455486437	"HET"
"FOXG_16484"	0,456757398	""
"FOXG_16824"	0,457533727	"MFS_1"
"FOXG_01626"	0,457847801	"ELFV_dehydrog_N ELFV_dehydrog ELFV_dehydrog_N"
"FOXG_11954"	0,459434149	"ketoacyl-synt Ketoacyl-synt_C KAsynt_C_assoc Acyl_transf_1"
"FOXG_04144"	0,459625262	"Sulfate_transp"
"FOXG_04982"	0,459908893	"DUF669"
"FOXG_12986"	0,460141665	"adh_short"
"FOXG_07149"	0,461374444	"zf-MYND"
"FOXG_12907"	0,462479076	"Glyco_hydro_43"
"FOXG_12200"	0,462543194	"Fungal_trans_2"
"FOXG_09844"	0,463400016	"FAD_binding_4 FAD_binding_4 BBE"
"FOXG_13102"	0,463775978	"GAD"
"FOXG_17153"	0,463820985	"Amidohydro_1"
"FOXG_13554"	0,464033221	""
"FOXG_12983"	0,464451546	""
"FOXG_12768"	0,464931474	"dCMP_cyt_deam_1"
"FOXG_08543"	0,464944365	
"FOXG_15745"	0,465253852	"Acetyltransf_1"
"FOXG_04677"	0,46557968	"ATP-grasp_2 MoeA_C Ligase_CoA"
"FOXG_00528"	0,465670049	""
"FOXG_10900"	0,465896049	"Ala_racemase_N Ala_racemase_N"
"FOXG_05962"	0,466383935	"GST_N GST_C"
"FOXG_09924"	0,466843208	"MFS_1 Spore_III_AF"
"FOXG_13631"	0,467176626	""
"FOXG_14663"	0,46749408	"adh_short"
"FOXG_05214"	0,467672337	"Methyltransf_23"
"FOXG_15833"	0,467934985	"Asp TAA-Trp-ring"
"FOXG_13517"	0,468080964	"Amidohydro_2"
"FOXG_09669"	0,468450982	"Fungal_trans_2"
"FOXG_00219"	0,468476959	Zn_clus Zn_clus"
"FOXG_07644"	0,468691326	"LamB_YcsF"
"FOXG_10959"	0,470158791	"MmgE_Prpd MmgE_Prpd PsbU"
"FOXG_16569"	0,470237011	""
"FOXG_15208"	0,470654404	"Fungal_trans_2"
"FOXG_11143"	0,470974221	""
"FOXG_14921"	0,471624313	"HSP20 HSP20"
"FOXG_05446"	0,472370246	"Acyl_transf_3"
"FOXG_01524"	0,472973087	"GGACT GGACT"
"FOXG_13125"	0,473055054	"DUF4700"
"FOXG_05806"	0,474352021	"Fungal_trans_2 DUF86"
"FOXG_15267"	0,474680931	"HeLo Pkinase HeLo"
"FOXG_17570"	0,474707254	"adh_short"
"FOXG_03532"	0,474980437	"Cofilin_ADF SpoVR GBS_Bsp-like"
"FOXG_17434"	0,475840509	"Amidase IcmF-related Amidase"
"FOXG_11463"	0,475886687	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_11929"	0,477052517	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_17023"	0,478201314	"DUF4246 2OG-Fell_Oxy_3"
"FOXG_10488"	0,478343865	""
"FOXG_15887"	0,480081085	"Methyltransf_23"
"ODX1" 0.481	3,77295E+11	
"FOXG_13552"	0,481570859	"NACHT Ank_2"
"FOXG_00527"	0,481781199	"Ammonium_transp Glucan_synthase Ammonium_transp"
"FOXG_11899"	0,482015017	""
"FOXG_10029"	0,482078502	"THOC7 PWWP"
"FOXG_13257"	0,482837623	"Amidase"
"FOXG_04653"	0,483661632	"MIT"
"FOXG_13698"	0,483718627	""

"FOXG_11399"	0,484111074	"Hamartin"
"FOXG_13066"	0,484151342	"Fungal_trans"
"FOXG_02247"	0,484607958	""
"FOXG_13587"	0,485997231	"AJAP1_PANP_C Podoplanin"
"FOXG_10140"	0,486297136	"His_Phos_1"
"FOXG_12667"	0,487157439	"Baculo_PEP_C"
"FOXG_11508"	0,487363462	Presenilin Nop14"
"FOXG_10098"	0,487518881	"Asp"
"FOXG_12381"	0,487711535	"Metallophos"
"FOXG_05765"	0,487897501	"zf-C3HC4_5 DUF3797 MAT1 MRP-S26"
"FOXG_15700"	0,4882798	"Glyco_hydro_88"
"FOXG_17340"	0,489754278	"B12-binding"
"FOXG_02047"	0,490477887	MFS_1 MFS_1"
"FOXG_07146"	0,490491486	""
"FOXG_09650"	0,491386456	""
"FOXG_11046"	0,492085189	"TauD"
"FOXG_06411"	0,492409329	"
"FOXG_01500"	0,492993319	"
"FOXG_12685"	0,493663539	""
"FOXG_17189"	0,493663539	"ADH_zinc_N_2"
"FOXG_17128"	0,494026385	"SRP-alpha_N"
"FOXG_13364"	0,494972404	"MMR_HSR1"
"FOXG_09923"	0,495435791	""
"FOXG_13342"	0,4966323	"MFS_1 DUF2583 TetR_N"
"FOXG_13653"	0,496714924	"ABC_trans_N ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR"
"FOXG_17029"	0,497424682	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_16428"	0,497880011	""
"FOXG_04773"	0,49942848	"MFS_1"
"FOXG_13010"	0,499601599	"VapB_antitoxin FAD_binding_4 BBE"
"FOXG_15261"	0,499993069	"Abhydrolase_6 Abhydrolase_6"

Anexo I. Tabla C2.3. Cambio relativo de la expresión de los genes activados por *carS* (log2).

Gen	Cambio Relativo (CR)	Dominios Conservados
"FOXG_02914"	681,1269944	"DUF2278 LTD He_PIG DUF4780 EPO_TPO DUF2278 LTD"
"FOXG_02907"	230,1211859	"GFO_IDH_MocA GFO_IDH_MocA"
"FOXG_12143"	215,9794142	"Amino_oxidase Amino_oxidase"
"FOXG_02910"	180,5844677	"Pyridoxal_deC Pyridoxal_deC Pyridoxal_deC Pyridoxal_deC"
"FOXG_12144"	178,6286895	"SQS_PSY"
"FOXG_11750"	178,0588089	"Ferritin_2"
"FOXG_12142"	147,4538826	"Bac_rhodopsin"
"FOXG_02920"	137,3963625	"Glyco_hydro_75 Glyco_hydro_75"
"FOXG_02853"	78,68899623	"adh_short DUF4332 adh_short"
"FOXG_16481"	60,06946876	"adh_short adh_short"
"FOXG_11695"	57,63127371	"DUF5097 Amidase"
"FOXG_02893"	55,21544605	Nodulin_late"
"FOXG_02919"	53,70371551	"FeoC Methyltransf_2 Methyltransf_2"
"FOXG_07672"	53,4849097	"RTA1"
"FOXG_02731"	44,57552857	"adh_short adh_short"
"FOXG_02864"	44,3680733	"HAD_2 HAD_2"
"FOXG_09962"	43,57745386	"Aldo_ket_red Dev_Cell_Death Rhabdo_M1"
"FOXG_12145"	41,34210664	"RPE65 PPI_Ypi1"
"FOXG_02357"	38,19495006	"Catalase Catalase-rel Catalase Catalase-rel"
"FOXG_02358"	34,99968421	Abhydrolase_5 Abhydrolase_5"
"FOXG_02836"	34,30554783	"K_trans K_trans"
"FOXG_03802"	33,84427718	"GFA"
"FOXG_02881"	33,36977375	"FAD_binding_3 FAD_binding_3"
"FOXG_02908"	31,07171569	"Sugar_tr MFS_1 Sugar_tr MFS_1"
"FOXG_08212"	29,87216715	"FAD_binding_3"
"FOXG_02831"	29,56482843	"ImpA_N"
"FOXG_16836"	28,43803743	"Catalase Catalase-rel"
"FOXG_02889"	27,62533396	"DUF1237 DUF1237"
"FOXG_02789"	26,79793633	"HhH-GPD HhH-GPD"
"FOXG_02862"	24,66186501	""
"FOXG_15936"	24,51987977	"PsbW"
"FOXG_02829"	23,66544262	""
"FOXG_02826"	23,25582153	"Hydrolase Cation_ATPase_C Hydrolase Cation_ATPase_C"
"FOXG_13071"	22,69527399	"Oxysterol_BP"
"FOXG_02823"	22,68740977	"FAD_binding_4 ALO FAD_binding_4 ALO"
"FOXG_02885"	22,4051736	"DUF3353"
"FOXG_02921"	22,31450657	"Cellulase Cellulase"
"FOXG_02882"	21,6304234	"MFS_1 MFS_1"
"FOXG_02896"	20,72456622	"DUF2353"
"FOXG_09735"	20,38194746	"Oxidored_FMN YadA_stalk"
"FOXG_02917"	18,72819557	"MFS_1 MFS_1"
"FOXG_02867"	17,81511634	"CHAT CHAT"
"FOXG_04945"	16,92108296	"Sporozoite_P67 Podoplanin VSP SKG6"
"FOXG_02918"	16,73631494	""
"FOXG_02844"	16,61702258	"ubiquitin ubiquitin"
"FOXG_02904"	16,031861	"Zn_clus DUF4995 WD40_alt Zn_clus"
"FOXG_02915"	15,28230231	"BTB Zn_Tnp_IS91 BTB"
"FOXG_07471"	15,0320514	"GAF_2"
"FOXG_02360"	14,70902791	"Zn_clus"
"FOXG_02909"	14,56536551	"Peptidase_S15 PepX_C Peptidase_S15 PepX_C"
"FOXG_02866"	13,52549979	"DUF676"
"FOXG_02830"	13,25045504	""
"FOXG_14952"	13,15345596	"PS_Dcarbxyase"
"FOXG_02939"	13,13559822	"Beta-lactamase Beta-lactamase Beta-lactamase"
"FOXG_09722"	12,69747739	"Sugar_tr"
"FOXG_15733"	12,20355861	"Caleosin"
"FOXG_02874"	12,11850646	""
"FOXG_10608"	11,96351977	"RPE65"
"FOXG_04476"	11,79268231	"Fasciclin DUF4265 Fasciclin"
"FOXG_09558"	11,51641677	"2_5_RNA_ligase2"
"FOXG_02856"	11,40939194	""
"FOXG_02892"	11,34928889	"MFS_1 MFS_1"
"FOXG_02855"	11,25286144	"NmrA NmrA"

"FOXG_02875"	11,06882364	"CN_hydrolase CPSase_L_chain CN_hydrolase"
"FOXG_04077"	11,00486849	"p450"
"FOXG_15721"	10,48234796	""
"FOXG_02890"	10,40229535	"Abhydrolase_3 Abhydrolase_3"
"FOXG_02897"	10,38766869	""
"FOXG_02865"	9,915943149	"CHAT CHAT"
"FOXG_11993"	9,700707695	"DUF968"
"FOXG_02879"	9,61748717	"AXE1 adh_short_C2 adh_short_C2"
"FOXG_02802"	9,547480048	""
"FOXG_10465"	9,529628674	""
"FOXG_02902"	9,355015216	"WSC WSC"
"FOXG_00472"	9,349310682	"adh_short adh_short"
"FOXG_03387"	9,347820297	"ATP-synt_C ELP6 DUF2686 ATP-synt_C"
"U1" 9.28041	936790423 ""	
"U1" 9.28041	936790423 ""	
"FOXG_11729"	9,266984766	""
"FOXG_08913"	9,193027141	"NAD_binding_8 Pyr_redox DUF3452"
"FOXG_02886"	8,894601681	""
"FOXG_02060"	8,680390826	"FAD_binding_7 FAD_binding_7"
"FOXG_02858"	8,557859539	"Aldedh DUF2199 Semialdehyde_dh Aldedh"
"FOXG_10951"	7,683693652	"OsmC OsmC"
"FOXG_11715"	7,671879178	"DUF1772"
"FOXG_00705"	7,523218543	""
"FOXG_02848,	7,4730	1164328958 ""
"FOXG_10209"	7,449842886	"Cation_efflux"
"FOXG_09966"	7,380865498	"AMP-binding PP-binding Anillin_N NAD_binding_4"
"FOXG_10652"	7,374473235	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_02887"	7,212452938	""
"FOXG_07233"	7,19193509	"MARVEL"
"FOXG_05310"	7,187250651	""
"FOXG_04047"	7,175503161	"VIT1"
"FOXG_02843"	7,020043645	"MFS_1 MFS_1"
"FOXG_11130"	7,009152433	""
"FOXG_01269"	6,918887102	"KGG KGG KGG KGG KGG KGG"
"FOXG_15712"	6,832056946	.BC_trans_N ABC_tran Pantoate_ligase ABC2_membrane PDR_CDR
"FOXG_09238"	6,746082679	"DinB_2 GyrI-like FGE-sulfatase"
"FOXG_02854"	6,689229299	IP_1 HMA E1-E2_ATPase Hydrolase HMA E1-E2_ATPase Hydrolase"
"FOXG_07101"	6,684825959	"PS_Dcarboxylase"
"FOXG_09239"	6,607021319	"Methyltransf_25"
"FOXG_02895"	6,414425242	"Cupin_2 Cupin_2"
"FOXG_15955"	6,360851915	""
"FOXG_02876"	6,310568591	"AA_permease_2 AA_permease_2"
"FOXG_02959"	6,192577419	"DUF3425 DUF3425"
"FOXG_02406"	6,150697398	"XFP_N XFP XFP_C XFP_N XFP XFP_C"
"FOXG_16837"	6,140175961	"Oxidored_molyb SLBB Mo-co_dimer"
"FOXG_10653"	6,103471312	"Rieske Pyr_redox_2 Reductase_C"
"FOXG_02900"	6,045493026	""
"FOXG_12111"	6,024117876	"VIT1"
"FOXG_07696"	6,009229411	"Cytochrom_B561 DUF4271"
"FOXG_06342"	5,995873725	"Pyrid_ox_like"
"FOXG_02827"	5,932252476	ion_ATPase_N DctQ E1-E2_ATPase Cation_ATPase_N E1-E2_ATPase"
"FOXG_11714"	5,931841298	"Arylesterase"
"FOXG_12807"	5,89327668	"DUF4072"
"FOXG_03376"	5,849851492	""
"FOXG_02940"	5,81488234	"CN_hydrolase CN_hydrolase"
"FOXG_13109"	5,808034407	""
"FOXG_04530"	5,377851805	""
"FOXG_09598"	5,349892862	"Glyco_hydro_71"
"FOXG_12863"	5,345037242	"DUF3140"
"FOXG_12347"	5,316327569	""
"FOXG_16582"	5,241464621	"NtCtMGAM_N Gal_mutarotase_2 Glyco_hydro_31"
"FOXG_02847"	5,205331341	JF3450 ADIP IncA PI3K_P85_iSH2 ERM Spc7 Yuri_gagarin ATG16 HMMR_N
"FOXG_12112"	5,129293055	"AA_permease_2"
"FOXG_02361"	5,10704935	"Fasciclin Fasciclin Fasciclin Fasciclin"
"FOXG_02877"	4,99463759	""
"FOXG_07531"	4,965778806	"Amino_oxidase Amino_oxidase"

"FOXG_02888"	4,891069619	""
"FOXG_10088"	4,872019812	"PLA2_B PLA2_B"
"FOXG_15375"	4,857688568	""
"FOXG_16644"	4,813946138	"Mem_trans"
"FOXG_03150"	4,777248752	"HhH-GPD TAFII55_N"
"FOXG_02863"	4,759895828	"DAO DAO"
"FOXG_02822"	4,757784739	"BCS1_N AAA Nit_Regul_Hom BCS1_N AAA"
"FOXG_02219"	4,754488037	"DUF1295 DUF1295"
"FOXG_02898"	4,713765535	"p450 p450"
"FOXG_02913"	4,700095269	"HNH_2"
"snR75" 4.69	4,795981397	
"FOXG_02937"	4,64812865	"Zn_clus Fungal_trans Fungal_trans"
"FOXG_14680"	4,606560625	""
"FOXG_02878"	4,579944132	"Acetyltransf_1"
"FOXG_01904"	4,553323619	"MFS_1 MFS_1"
"FOXG_03307"	4,491477168	"EI24"
"FOXG_02911"	4,45952484	"Abhydrolase_6 Abhydrolase_6"
"FOXG_01587"	4,419245259	"ADH_zinc_N ADH_zinc_N"
"FOXG_14639"	4,410860091	"DUF2855 HLH HALZ"
"FOXG_14810"	4,374657287	""
"FOXG_17616"	4,358827167	"Aminotran_3"
"FOXG_01106"	4,317511439	""
"FOXG_10458"	4,258395657	"P4Ha_N DUF4449"
"FOXG_09754"	4,147609299	""
"FOXG_02916"	4,125159779	"TauD TauD"
"FOXG_03933"	4,114223019	"FMO-like"
"FOXG_11435"	4,100756273	"PhyH"
"FOXG_05118"	4,090791478	"Cyt-b5 Acyl-CoA_dh_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1"
"FOXG_09957"	4,066873172	"zf-C2HC5 DUF2256 Ecl1"
"FOXG_16486"	4,050415752	"Zn_clus Fungal_trans_2"
"FOXG_07663"	4,03315821	"DUF1074 Phasin_2 Apolipoprotein TipAS"
"FOXG_17014"	4,007354112	"NPP1"
"FOXG_02405"	3,995566317	"Catalase Catalase-rel DJ-1_PfpI Catalase Catalase-rel"
"FOXG_03808"	3,956322411	""
"FOXG_05475,"	3,938	64666787132 ""
"FOXG_02421"	3,930819179	""
"FOXG_07655"	3,877858066	"GFA Rpr2"
"FOXG_02906"	3,8731302	""
"FOXG_11766"	3,839264618	"NmrA"
"FOXG_05847"	3,81520347	""
"FOXG_02808"	3,795973708	"Sugar_tr DUF1201 Sugar_tr"
"FOXG_06019"	3,793974547	"adh_short FlgD_ig"
"FOXG_04927"	3,778857197	"DUF3292 Pex24p VIR_N Peroxin-22"
"FOXG_02413"	3,777861992	""
"FOXG_13182"	3,764739392	"GFO_IDH_MocA AAA_33 GFO_IDH_MocA_C"
"FOXG_03176"	3,746568944	"Methyltransf_11"
"FOXG_02842"	3,733503284	"PAN_1"
"FOXG_02859"	3,731537023	""
"FOXG_06292"	3,665195111	"Aconitase Aconitase_C"
"FOXG_04966"	3,661056402	"NmrA NadA"
"FOXG_03809"	3,641997672	"Zip Zip Zip"
"FOXG_00361"	3,606076493	"TspO_MBR TspO_MBR"
"FOXG_05874"	3,582706845	"Zn_clus"
"FOXG_17470"	3,579852139	""
"FOXG_03944"	3,521743898	"Glyco_hydro_32N Glyco_hydro_32C"
"FOXG_13772"	3,508683948	"p450"
"SNORD18" 3.	5,085380294	
"FOXG_02828"	3,504624801	"Zn_clus Zn_clus"
"FOXG_09803"	3,502439184	"Sulfotransfer_3"
"FOXG_06437"	3,501638133	"Snoal"
"EG-1" 3.490	4,426322375	
"FOXG_05101"	3,48947501	"DUF1761"
"FOXG_12392"	3,486960448	"CoA_transf_3 FAD_binding_3"
"FOXG_13856"	3,483554176	"C2 C2"
"FOXG_12107"	3,480127108	"Thioredoxin"
"FOXG_15796"	3,430288696	""

"FOXG_02947"	3,400766612	"Chordopox_L2 DUF2611"
"FOXG_02801"	3,395961257	"Glyco_transf_90 Glyco_transf_90"
"FOXG_00668"	3,394878635	"GFO_IDH_MocA GFO_IDH_MocA"
"FOXG_04939"	3,366127913	"DUF1264"
"FOXG_15291"	3,356714881	"Sugar_tr Sugar_tr"
"FOXG_15803"	3,342436148	"
"FOXG_10328"	3,326742035	"ILVD_EDD"
"FOXG_15642"	3,314175496	"adh_short"
"FOXG_15711"	3,299574518	"
"FOXG_08238"	3,288911072	"Flavodoxin_1 Radical_SAM Wyosine_form"
"FOXG_16799"	3,276010543	"
"snosnR61" 3	3,265717508	"
"snosnR61" 3	3,265717508	"
"FOXG_11751"	3,261193399	Hemerythrin Peptidase_S46 UBN2_3 Hemerythrin"
"FOXG_09984"	3,252682488	"Sugar_tr DUF3681"
"FOXG_07080"	3,250721588	"Gal_mutarotas_2"
"FOXG_02349"	3,233955888	Iro_3 Glyco_hydro_3_C Fn3-like Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C Fn3-like"
"FOXG_09725"	3,229766797	"Chromo"
"FOXG_03570"	3,22473364	"DNA_photolyase FAD_binding_7"
"FOXG_04893"	3,189587817	"DUF3429"
"FOXG_06989"	3,176526379	"ANAPC3"
"FOXG_04033"	3,1728515	"Mac Hexapep Hexapep"
"FOXG_09796"	3,154016046	"Dyp_perox"
"FOXG_03104"	3,146700782	"FAD_binding_4 ALO"
"FOXG_16869"	3,143539737	"Glyco_hydro_16"
"FOXG_04971"	3,126741606	"MCU Glyco_trans_4_4 DUF1281"
"FOXG_01529"	3,12357896	"NAP BUD22 PGBA_C Beta-lactamase NAP"
"FOXG_00629"	3,107339769	"
"FOXG_02872"	3,100627037	"Tenui_NS3"
"FOXG_08771"	3,096911165	"SBP56"
"FOXG_02069"	3,079188098	"
"FOXG_13990"	3,077950435	"
"FOXG_04754"	3,065027462	"NmrA"
"FOXG_01103"	3,060293452	"Hemerythrin Hemerythrin"
"FOXG_04881"	2,995963401	"AP_endonuc_2 DUF2726"
"FOXG_10189"	2,978590926	"TPP_enzyme_N TPP_enzyme_M TPP_enzyme_C"
"FOXG_02931"	2,973969806	"VWA_2 Vwaint Vint VWA_2 Vwaint Vint"
"FOXG_16787"	2,973825511	"Methyltransf_23 CFIA_Pcf11"
"FOXG_03951"	2,971929721	"p450"
"FOXG_16877"	2,968326933	"VIT1"
"FOXG_02571"	2,938968711	"AAA_28 AAA_28"
"FOXG_03784"	2,935975644	"DUF2306 DUF1416 DUF420"
"FOXG_12652"	2,935975644	"
"FOXG_14211"	2,91508914	"zf-H2C2_2 zf-H2C2_2 zf-C2HE zf-H2C2_2"
"FOXG_16626"	2,910748116	"Hid1 Chromo"
"FOXG_15671"	2,908045818	"
"FOXG_14995"	2,901743504	"Ank_2"
"FOXG_17612"	2,901743504	"
"FOXG_03504"	2,900536954	"
"FOXG_02168"	2,893689248	"ADH_N ADH_zinc_N ADH_zinc_N"
"FOXG_05311"	2,887097841	"polyprenyl_synt"
"FOXG_08697"	2,885797365	"Catalase Catalase-rel"
"FOXG_15658"	2,883218154	"
"FOXG_17686"	2,879962447	"
"FOXG_16444"	2,873740915	"
"FOXG_01256"	2,866678273	"
"FOXG_04132"	2,825683733	"
"FOXG_13788"	2,793492603	"peroxidase"
"FOXG_09698"	2,783210448	"Dioxygenase_N Dioxygenase_C MG1 DUF4198"
"FOXG_17161"	2,782496745	"
"FOXG_07352"	2,77260097	"
"FOXG_17245"	2,770506977	"
"FOXG_01229"	2,763142564	"adh_short adh_short"
"FOXG_05896"	2,752495109	"FAD_binding_3"
"FOXG_02794"	2,725177121	"MoeA_N MoCF_biosynth MoeA_C MoeA_N MoCF_biosynth"
"FOXG_03949"	2,72259049	"ADH_N ADH_zinc_N"

"FOXG_09732"	2,712174493	""
"FOXG_16636"	2,70883027	"Fe-ADH"
"FOXG_12856"	2,698317286	"Sugar_tr Trp_oprn_chp"
"FOXG_13370"	2,693944259	""
"FOXG_07932"	2,686820609	"AAA_18"
"FOXG_00142"	2,679641499	"peroxidase peroxidase"
"FOXG_02824"	2,67275945	"zf-C2H2"
"FOXG_12052"	2,671796263	"DUF1689 Ni_hydr_CYTB"
"FOXG_02795"	2,671000044	"Molybdop_Fe4S4 Molybdopterin SGT1 Molydop_binding"
"FOXG_15921"	2,658679734	"Cu-oxidase_2"
"FOXG_02837"	2,655051785	"Phage_holin_Dp1 FUSC_2 ArAE_2"
"FOXG_01142"	2,648820351	"malic Malic_M malic Malic_M"
"FOXG_13541"	2,643354651	""
"FOXG_09098"	2,640534516	"PALP adh_short"
"FOXG_14999"	2,639454872	""
"FOXG_00906"	2,632968023	"
"FOXG_04352"	2,628591581	""
"FOXG_07801"	2,623331269	"DUF1757 Gly-zipper_Omp"
"FOXG_16405"	2,61937025	"Hormone_3"
"FOXG_08859"	2,614980159	""
"FOXG_12148"	2,609728996	"DAO"
"FOXG_02541"	2,605969141	""
"FOXG_10049"	2,591953794	""
"FOXG_06197"	2,58552992	"SelR"
"FOXG_10170"	2,579801387	""
"FOXG_10388"	2,558485399	"DUF3830"
"FOXG_03921"	2,557581121	"Zn_clus"
"FOXG_10760"	2,54541343	""
"FOXG_06227"	2,536606968	""
"FOXG_12358"	2,533707527	"adh_short"
"FOXG_08010"	2,528829903	"DJ-1_PfpI"
"FOXG_06625"	2,523594305	"NACHT WD40 WD40 Luteo_P1-P2 WD40 WD40 WD40"
"FOXG_04561"	2,520919413	"Tyrosinase Tyrosinase"
"FOXG_01367"	2,519731483	"21 HisKA_7TM DUF2207 Glucos_trans_II PLDc_N DUF3951 PLDc_N"
"FOXG_03444"	2,519452051	"Chal_sti_synt_N Chal_sti_synt_C"
"FOXG_09745"	2,511605715	"Glyco_hydro_76"
"FOXG_00184"	2,509047877	"DUF2417 Abhydrolase_5 DUF2417"
"FOXG_13883"	2,507778626	""
"FOXG_12850"	2,493254234	""
"SIX1" 2.493	1,85107048	
"FOXG_17687"	2,49242484	"LysM LysM LysM LysM"
"FOXG_02901"	2,491474831	""
"FOXG_02820"	2,483595116	"Zn_clus Fungal_trans_2 Zn_clus Fungal_trans_2"
"FOXG_03535"	2,479673203	FAD_binding_4 BBE"
"FOXG_02664"	2,469005414	"MFS_1 MFS_1"
"FOXG_07061"	2,468440722	"RecQ_Zn_bind"
"FOXG_12093"	2,466969707	""
"FOXG_00857"	2,462015765	"DUF4599 Methyltransf_16 Methyltransf_16"
"FOXG_12136"	2,453038709	""
"FOXG_04984"	2,448231529	""
"FOXG_00282"	2,447976995	"Glyco_hydro_15 Glyco_hydro_15"
"FOXG_04875"	2,446195994	""
"FOXG_10340"	2,445094119	"SPG48 DUF445 DUF4449"
"FOXG_09357"	2,441046876	"DUF3716"
"FOXG_02952"	2,432837568	Peptidase_M35 Peptidase_M35"
"FOXG_15757"	2,428776943	"Dicty_CAR DUF4018"
"FOXG_02838"	2,413120569	"MFS_1 MFS_1"
"FOXG_07483"	2,406606052	Ldh_1_N Ldh_1_C DUF1844"
"FOXG_17779"	2,400025942	""
"FOXG_09276"	2,399643351	"Mito_carr Mito_carr Mito_carr"
"FOXG_09028"	2,395073616	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_14187"	2,393065691	""
"FOXG_12860"	2,391506977	"DUF669 adh_short"
"FOXG_09667"	2,384918557	"Epimerase"
"snoZ196" 2.	3,825888249	
"FOXG_12302"	2,377441176	"MFS_1 MFS_1"

"FOXG_15752"	2,375481547	"GST_N GST_C"
"FOXG_13997"	2,373884923	"p450 Lipoprotein_18"
"FOXG_02791"	2,368477555	"TENA_THI-4"
"FOXG_13540"	2,36373778	gE Amnionless SARAF DUF912 DUF3377 Shisa zf-HC5HC2H_2 zf-RING_2"
"FOXG_16634"	2,356327386	"Peroxidase_2"
"FOXG_09680"	2,354841569	"MIP"
"FOXG_03009"	2,354776279	"DUF2823 DUF2823"
"FOXG_15920"	2,353813474	"Cu-oxidase"
"FOXG_11198"	2,351791235	"DUF1772 DUF1772"
"FOXG_03800"	2,350487487	"DAO"
"FOXG_10060"	2,347703147	"UDPG_MGDP_dh_N UDPG_MGDP_dh UDPG_MGDP_dh_C"
"FOXG_09114"	2,331567182	"AA_permease"
"FOXG_04956"	2,328224214	"DUF218"
"FOXG_15950"	2,324724896	"Thiol-ester_cl"
"FOXG_10479"	2,324724896	""
"FOXG_06680"	2,32008876	"RVT_1"
"FOXG_03257"	2,31549397	"Methyltransf_33"
"FOXG_17545"	2,314001821	""
"FOXG_16646"	2,312158021	""
"FOXG_05414"	2,306651418	""
"FOXG_12334"	2,301620538	"adh_short"
"FOXG_03388"	2,299914134	"tRNA_synt_1f"
"FOXG_03998"	2,29731709	"DUF3099"
"FOXG_04951"	2,296330027	"Oxidored_FMN"
"FOXG_04459"	2,286863095	"MBOAT_2"
"FOXG_06820"	2,286593638	"2-Hacid_dh 2-Hacid_dh_C"
"FOPHO5" 2.2	8,391664766	
"FOXG_14480"	2,281907008	"FANCF Endonuclease_1"
"FOXG_08944"	2,281843741	""
"FOXG_10102"	2,279756913	"DAO"
"FOXG_04002"	2,279551495	"His_Phos_2"
"FOXG_06027"	2,278461511	""
"FOXG_16407"	2,274831994	"MFS_1"
"FOXG_08828"	2,266443191	""
"FOXG_04451"	2,265595021	"Abhydrolase_1 SPARC_Ca_bdg NGF Abhydrolase_4"
"FOXG_09890"	2,264621588	"Flavodoxin_2"
"FOXG_11033"	2,261750829	""
"FOXG_03506"	2,261108152	"p450"
"FOXG_17337"	2,257881858	"WD40 WD40 WD40 SAND WD40"
"FOXG_16581"	2,250834528	"MFS_1"
"FOXG_11416"	2,250569317	"AltA1"
"FOXG_14566"	2,241244434	""
"FOXG_10468"	2,235968711	""
"FOXG_08749"	2,233768999	""
"FOXG_13694"	2,229236994	"Peptidase_S10 Toxin_trans"
"FOXG_12721"	2,228634451	"Cyt-b5 Acyl-CoA_dh_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1"
"FOXG_07000"	2,228418194	"ABC_tran ABC_tran_Xtn ABC_tran"
"FOXG_12429"	2,226009886	"Uma2"
"FOXG_01081"	2,225223119	"HLH Methyltransf_17 HLH"
"FOXG_14305"	2,222463923	"Methyltransf_23"
"FOXG_05089"	2,221878612	"DUF3455"
"FOXG_02244"	2.221478224885 "	"
"FOXG_10393"	2,217770377	"NmrA"
"FOXG_08650"	2,213286172	""
"FOXG_16510"	2,208612009	""
"FOXG_15398"	2,200833492	"MFS_1 DUF1049 MFS_1"
"FOXG_02423"	2,19949146	"FMO-like FMO-like"
"FOXG_12261"	2,197677969	"PBP"
"FOXG_17685"	2,19653578	"LysM LysM Chitin_bind_1 Glyco_hydro_18"
"FOXG_07583"	2,194025054	""
"FOXG_14649"	2,192337635	"Fungal_trans_2"
"FOXG_02933"	2,188481214	"DUF3669"
"FOXG_02606"	2,185343401	"His_Phos_1 His_Phos_1 His_Phos_1 His_Phos_1"
"FOXG_13291"	2,182043708	"Fungal_trans_2"
"FOXG_12338"	2,18130272	"AA_permease"
"FOXG_03767"	2,18051664	"Glyoxalase"

"FOXG_14868"	2,179020849	"p450"
"FOXG_05835"	2,176303856	"Fox-1_C"
"FOXG_17336"	2,171090704	""
"FOXG_02930"	2,165995131	""
"FOXG_03637"	2,163804264	"Caleosin"
"FOXG_04650"	2,162559759	"TPR_2 DUF1100"
"FOXG_17611"	2,158650978	"Zn_clus"
"FOXG_11647"	2,157469254	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_06679"	2,156691764	"RNase_H"
"FOXG_10116"	2,154525241	"Form_Nir_trans Form_Nir_trans"
"FOXG_15422"	2,15248025	"BCS1_N AAA BCS1_N AAA"
"FOXG_03670"	2,148187617	"MatE MatE"
"FOXG_02416"	2,14786006	""
"FOXG_05157"	2.145613173277 "	"
"FOXG_03474"	2,143056669	"SARAF DUF3984"
"FOXG_03205"	2,134576696	""
"FOXG_01130"	2,134251214	""
"FOXG_17031"	2,134103284	"MCRA"
"FOXG_07903"	2,130305002	""
"FOXG_04914"	2.129950643737 "	DUF829"
"FOXG_04372"	2,128017478	"NmrA Ish1"
"FOXG_15734"	2,126351347	"Aldo_ket_red HGD-D"
"FOXG_12795"	2,125378813	"tRNA_U5-meth_tr"
"FOXG_11619"	2,123965011	"CDC45 HLH TSC22"
"FOXG_04045"	2,123817794	"cobW cobW CobW_C PI3K_1B_p101 CobW_C"
"FOXG_00216"	2,122346186	"Brix Brix"
"FOXG_08836"	2,120419921	"KIAA1430"
"FOXG_10596"	2,120052513	"Fungal_trans_2"
"FOXG_06351"	2,119317886	ain GATase CPSase_L_D2 CPSase_L_D3 CPSase_L_D2 MGS OTCace_N OTCace"
"FOXG_05041"	2,117761318	"MFS_1 BRI3BP"
"FOXG_10597"	2,115751222	"FAD_binding_4 BBE"
"FOXG_11417"	2,115516591	"GST_N_3 GST_C_2"
"FOXG_15758"	2,113332836	"Methyltrans_RNA"
"FOXG_03237"	2,113303539	"DUF3568 NUC153"
"FOXG_11112"	2,112307689	UC130_3NT SDA1 Cas_APE2256 Dict-STAT-coil NUC130_3NT SDA1"
"FOXG_02845"	2,11074164	"FTR1 FTR1"
"FOXG_05677"	2,110141873	"OPT"
"FOXG_09151"	2,108299752	"Ribosomal_L1 CcmE"
"FOXG_08949"	2,106225639	""
"FOXG_02451"	2,101661029	""
"FOXG_15276"	2,100219331	"Cupin_7 Cupin_7"
"FOXG_03657"	2,093069185	"Bd3614-deam"
"FOXG_02925"	2,092721021	""
"FOXG_09965"	2,091952364	"Fungal_trans_2"
"FOXG_17520"	2,091647879	"Acyl-CoA_dh_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1"
"FOXG_15621"	2,087447625	"Xan_ur_permease Xan_ur_permease"
"FOXG_14832"	2,085509668	""
"FOXG_06141"	2,083457975	""
"FOXG_02007"	2,078784202	"Methyltransf_26"
"FOXG_04413"	2,077444593	"GFO_IDH_MocA GFO_IDH_MocA_C"
"FOXG_11787"	2,0746673	"Transferase Dynamin_M"
"FOXG_15373"	2,071735752	Chitin_bind_1 Glyco_hydro_18 LysM LysM Chitin_bind_1 Glyco_hydro_18"
"FOXG_17769"	2,069826728	""
"FOXG_08792"	2,068435542	"APH"
"FOXG_14997"	2,065670293	""
"FOXG_10602"	2,064911571	"DUF3425"
"FOXG_02739"	2,061822303	"Abhydrolase_6"
"FOXG_10359"	2,059265717	""
"FOXG_04183"	2,055999623	"DEAD Helicase_C DUF1998"
"FOXG_07824"	2,053749181	"TFIIF_alpha Rrp15p"
"FOXG_03952"	2,046700495	"2OG-Fell_Oxy_3"
"FOXG_07792"	2,046374228	"Apolipoprotein DUF883 YtxH"
"FOXG_03507"	2,046260756	"AMP-binding AMP-binding_C"
"FOXG_08265"	2,045438272	"AAA_16 GTP_EFTU AARP2CN RIBIOP_C"
"FOXG_03441"	2,04416266	"AATF-Che1 TBPIP TRAUB"
"FOXG_05356"	2,042802883	CsbD CsbD FlgT_M"

"FOXG_13870"	2,041557215	"CARD DUF910"
"FOXG_03739"	2,040835642	"Exo_endo_phos"
"FOXG_12821"	2,040496166	"SOG2 Fe-S_biosyn CPT_N"
"FOXG_09595"	2,040255738	""
"FOXG_07484"	2,039195366	""
"FOXG_14092"	2,038856163	6 FAM76 Troponin DUF4631 MPS2 IncA I_LWEQ Syntaphilin DUF489
"FOXG_01019"	2,037358692	"Pescadillo_N BRCT_2 Pescadillo_N"
"FOXG_14242"	2,036553903	""
"FOXG_00864"	2,033126526	"WD40"
"FOXG_04544"	2,032337496	""
"FOXG_14463"	2,031323478	""
"FOXG_04042"	2,028776585	""
"FOXG_15909"	2,024211447	""
"FOXG_07070"	2,024211447	"DivIC Tropomyosin_1"
"FOXG_05885"	2,019138677	"FAD_binding_2 Cyt-b5 BRK"
"FOXG_09979"	2,017543808	"Reovirus_Mu2"
"FOXG_03567"	2,016830722	"CMS1"
"FOXG_09391"	2,013408626	"Kri1 Kri1_C"
"FOXG_11785"	2,010856318	"adh_short RNA_pol_Rpb1_4"
"FOXG_02809"	2,010298867	"ADH_N ADH_zinc_N_2 ADH_N ADH_zinc_N_2"
"FOXG_17617"	2,006804391	"MFS_1"
"FOXG_02576"	2,006150723	""
"FOXG_11381"	2,005233164	"Peptidase_M19"
"FOXG_07195"	2,002982755	""
"FOXG_07584"	2,002830041	""
"FOXG_03770"	2,002774511	idored_molyb Mo-co_dimer Cyt-b5 FAD_binding_6 NAD_binding_1"
"FOXG_17664"	2,002621813	"Iron_transport adh_short adh_short"

Anexo I. Tabla C2.4. Cambio relativo de la expresión de los genes reprimidos por *carS* (log2).

Gen	Cambio Relativo (CR)	Dominios Conservados
"FOXG_11931"	0	
"FOXG_11986"	0,040338745	"Pyr_redox_2 GMC_oxred_N PhoPQ_related GMC_oxred_C"
"FOXG_11987"	0,060297416	"CFEM DUF308"
"FOXG_10691"	0,060392784	"MANEC PAN_4 MANEC PAN_4"
"FOXG_02448,"	0,07399	18407271046 ""
"FOXG_09634"	0,085466923	""
"PG5" 0.0862	0,411364692	
"FOXG_16516"	0,09430578	"Pec_lyase_C"
"FOXG_04683"	0,097067356	""
"FOXG_13304"	0,100587295	"Peroxidase_2"
"FOXG_11988"	0,107354904	"Peroxidase_2"
"FOXG_13044"	0,111553679	"HSP20 HSP20"
"FOXG_10044"	0,117034842	"Oxidored_FMN"
"FOXG_10384"	0,123737097	""
"FOXG_10692"	0,123868392	"MANEC PAN_4 PAN_4"
"FOXG_09678"	0,124062585	"SRR1 Exo_endo_phos_2"
"FOXG_08903"	0,130830426	"PAN_1 PAN_1 Glyoxal_oxid_N Kelch_6 Kelch_1 Glyoxal_oxid_N Kelch_6 DUF1929"
"FOXG_07527"	0,133308437	"Glyco_hydro_12"
"FOXG_07425"	0,133389776	"Oxidored_FMN Pox_E2-like"
"FOXG_04319"	0,137857532	"CN_hydrolase"
"FOXG_17702"	0,145077933	"bZIP_1 DUF5094 Exonuc_VII_L IncA DUF972 Shugoshin_N bZIP_1"
"FOXG_17642"	0,150911013	"Acyf_transf_3 Strep_pep"
"FOXG_07395"	0,152477682	"
"FOXG_10052"	0,153479726	"Glyco_hydro_28"
"FOXG_00405"	0,161921897	"RhGB_N fn3_3 CBM-like RhGB_N fn3_3 CBM-like"
"FOXG_11698"	0,164388354	"Glyco_hydro_61 A2M_N"
"FOXG_17641"	0,165768294	""
"FOXG_09610"	0,166716639	"Alginate_lyase Chorion_1"
"XYL2" 0.168	0,222198449	
"FOXG_02513"	0,169555556	"Pec_lyase_C Pec_lyase_C"
"FOXG_11813"	0,169719001	"EHN"
"FOXG_13045"	0,174327249	"AA_permease"
"FOXG_09647"	0,174839129	"Glyco_hydro_61"
"FOXG_17596"	0,180389841	"adh_short"
"FOXG_11958"	0,183749216	""
"FOXG_14564"	0,184897805	"Peptidase_S8 PA fn3_5 FlgD_ig"
"FOXG_15346"	0,186990904	"Glyco_hydro_62 Glyco_hydro_62"
"FOXG_10810"	0,187273672	"DUF2341"
"FOXG_06050"	0,190937185	"NmrA"
"FOXG_16537"	0,197029014	"Cupin_5"
"FOXG_00784"	0,197288668	""
"FOXG_16864"	0,197684272	CoA_transf_3 FAD_binding_3 FAD_binding_3"
"FOXG_13568"	0,209038416	"adh_short CRCB"
"FOXG_16797"	0,209727798	"Amino_oxidase"
"FOXG_13455"	0,211847792	"EthD"
"PRTA" 0.213	0,417442969	
"FOXG_03451"	0,215468668	"Epimerase"
"FOXG_13442"	0,216258688	"MFS_1"
"FOXG_00220"	0,219262348	"ADH_N ADH_zinc_N ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_16939"	0,219644153	"p450"
"FOXG_03860"	0,224691897	""
"FOXG_11824"	0,224774456	"PTPS"
"FOXG_16638"	0,227904292	"Asp"
"FOXG_04686"	0,229495855	""
"FOXG_05948"	0,231658255	"Pec_lyase_C"
"FOXG_09111"	0,231884774	450 p450 Thioredoxin"
"FOXG_07632,"	0,23267	3691658391 ""
"FOXG_04765"	0,23445452	"Pectate_lyase_3 Glyco_hydro_28"
"FOXG_11081"	0,235877547	Cellulase Cellulase"
"FOXG_12994"	0,237533023	""
"FOXG_16888"	0,238790939	"zf-C2H2_jaz LRS4 zf-C2H2_2"
"FOXG_14915"	0,240685311	"Pkinase"
"FOXG_15403"	0,243084532	"GFO_IDH_MocA GFO_IDH_MocA"
"FOXG_04682"	0,243298613	"Epimerase Glyco_transf_4 PE-PPE Hira Cna_B"

"FOXG_00994"	0,244243149	""
"FOXG_10361"	0,245735807	"TauD"
"FOXG_13024"	0,251142831	"AMP-binding AMP-binding_C PP-binding Condensation Condensation"
"FOXG_04706"	0,257818912	"NmrA"
"FOXG_05153"	0,258432604	"He_PIG He_PIG He_PIG DUF4448 TMEM154"
"FOXG_13000"	0,258828789	"Hydrolase_like"
"FOXG_07109"	0,260257203	"HSP20 HSP20"
"FOXG_11960"	0,262367331	""
"FOXG_11996"	0,263462585	"NmrA"
"FOXG_10662"	0,26446707	""
"FOXG_17168"	0,264769712	""
"FOXG_17007"	0,264938608	"adh_short CENP-C_C DUF867"
"FOXG_10969"	0,266640901	Ribosomal_L37ae"
"FOXG_05883"	0,269478112	""
"FOXG_00378"	0,273330811	"AAA Cob_adenotrans ERM APG6 IncA OEP DUF1640"
"FOXG_13050"	0,275180472	Aldo_ket_red"
"FOXG_16536"	0,277734826	"dCMP_cyt_deam_1 IlvC"
"FOXG_17699"	0,278958033	"Glyoxalase_2"
"FOXG_15383"	0,280847721	"Choline_kinase Choline_kinase Choline_kinase"
"FOXG_16857"	0,282397652	"FAD_binding_4 BBE"
"FOXG_08998"	0,283948265	Aldedh"
"FOXG_04794"	0,286006532	"HET"
"FOXG_03778"	0,28903578	""
"FOXG_12958"	0,289755911	""
"FOXG_14893"	0,291795593	DUF1348"
"FOXG_15250"	0,29206067	"Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C VWA Fn3-like Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C"
"FOXG_10213"	0,294941349	"ANAPC5 DUF3500"
"FOXG_17524"	0,297600736	"
"FOXG_00148"	0,299232753	"AltA1"
"FOXG_08688"	0,300930033	"GP4"
"FOXG_15183"	0,306865848	"Zn_clus Fungal_trans_2 Zn_clus Fungal_trans_2"
"FOXG_11336"	0,307153132	""
"snR32" 0.30	0,759628834	
"FOXG_08375"	0,311421402	"Dicty_CAR Sdh_cyt"
"FOXG_09637"	0,311434354	"Bul1_N Bul1_C"
"FOXG_13089"	0,311676222	""
"FOXG_15303"	0,314255522	"ADC ADC"
"FOXG_16872"	0,315915362	"APH"
"FOXG_09690"	0,316182626	"adh_short"
"FOXG_05733"	0,317918748	"adh_short"
"FOXG_08866"	0,31968656	HiskA HATPase_c"
"FOXG_05995"	0,325540738	"ThrE ThrE_2"
"FOXG_17141"	0,3256897	"Lactonase"
"FOXG_05066"	0,32612343	"Methyltransf_11"
"FOXG_14658"	0,326412905	""
"FOXG_11829"	0,328009613	"Epimerase"
"FOXG_11965"	0,329522755	"p450"
"FOXG_04142"	0,329577578	"ABC_tran ABC_membrane ABC_membrane zf-ISL3 ABC_tran"
"FOXG_11459"	0,332037939	""
"FOXG_11246"	0,332551573	""
"FOXG_11953"	0,332646094	"ABC_tran ABC_membrane ABC_tran"
"FOXG_11685"	0,332839832	"Sua5_yciO_yrdC"
"FOXG_02504"	0,333105251	""
"FOXG_14505"	0,335491937	"Glyco_hydro_61"
"FOXG_14673"	0,337041933	"Peptidase_A4 Peptidase_A4"
"FOXG_15249"	0,337729475	"GTP1_OBG Peptidase_C54 Epimerase Epimerase"
"FOXG_04566"	0,339038261	"GST_N GST_C"
"FOXG_12951"	0,339282753	"adh_short"
"FOXG_17154"	0,339875907	"Amidohydro_1 Ntox43 HTH_Mga"
"FOXG_16544"	0,343563815	AA_permease_2"
"FOXG_17219"	0,343730553	"DAO"
"FOXG_06987"	0,34390214	""
"FOXG_01314"	0,343909292	"Glyco_hydro_88 Glyco_hydro_88"
"FOXG_05449"	0,343983197	"Mucin"
"FOXG_08292"	0,344517698	Cation_efflux BPD_transp_2"
"FOXG_17574"	0,345313825	"Macoilin Apt1"
"FOXG_00382"	0,347277296	""

"FOXG_16980"	0,347790396	"Tyrosinase"
"FOXG_02133"	0,347874781	"Zn_clus Zn_clus"
"FOXG_15242"	0,349113972	"ADH_N ADH_zinc_N ADH_zinc_N"
"FOXG_10935"	0,349222883	"MFS_1 ESSS"
"FOXG_02490"	0,349651597	"Cerato-platanin"
"FOXG_04696"	0,350236173	"PALP adh_short Cofilin_ADF"
"FOXG_17603"	0,350768232	""
"FOXG_04838"	0,353521534	"Cutinase"
"FOXG_13271"	0,355630262	"Amidase"
"FOXG_02583"	0,356719009	""
"FOXG_12175"	0,358859247	""
"FOXG_13496"	0,359339641	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_10110"	0,359618713	"Pyridoxal_deC DUF1541"
"FOXG_16570"	0,360065181	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_11101"	0,360297364	HIP1_clath_bdg Tcp11 Tcp11"
"FOXG_02344"	0,360594676	Acetyltransf_1 Acetyltransf_1"
"FOXG_08511"	0,36062717	"Methyltransf_23"
"FOXG_08999"	0,361202554	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_09945"	0,36642758	""
"FOXG_08711"	0,366491082	"Beta-lactamase B5"
"FOXG_10635"	0,366831644	""
"FOXG_15750"	0,367926629	"Pyr_redox_2"
"FOXG_14598"	0,36904023	""
"FOXG_09604"	0,369454857	"Abhydrolase_6"
"FOXG_16565"	0,369541937	"DUF2746 SinI Ank_4 DUF4959"
"FOXG_03633"	0,369603417	""
"FOXG_13585"	0,372040091	""
"FOXG_08902"	0,373334309	""
"FOXG_17216"	0,373657918	"PALP DAO"
"FOXG_14295"	0,373774486	""
"NIRK" 0.374	0,783670349	
"FOXG_01378"	0,375163141	"Dioxygenase_N Dioxygenase_C DUF824 Dioxygenase_N Dioxygenase_C"
"FOXG_08698"	0,37546231	"
"FOXG_03894"	0,377332952	"Fungal_trans"
"FOXG_12208"	0,378343876	""
"FOXG_10983"	0,381638864	"Cyt-b5 FA_desaturase Cyt-b5 FA_desaturase"
"FOXG_13676"	0,381638864	"AAA_13 Fez1 TSNAXIP1_N Flij"
"FOXG_05663"	0,381861135	""
"FOXG_09987"	0,382539333	"Galactosyl_T"
"FOXG_17024"	0,383157646	"CoA_transf_3"
"FOXG_02457"	0,385128021	"Chitin_bind_3 Serglycin Chitin_bind_3"
"FOXG_15800"	0,38736889	"Zn_clus"
"FOXG_17746"	0,389015623	"HMG_box"
"FOXG_13456"	0,389317743	"Pyr_redox_2"
"FOXG_05061"	0,390130853	"NmrA"
"FOXG_08880"	0,391482575	"SesA YgaB COG2 DUF2420 DASH_Dam1 LAGLIDADG_WhiA"
"FOXG_14630"	0,391737732	"
"FOXG_04097"	0,392194171	""
"FOXG_17635"	0,393809549	"PAP2"
"FOXG_07023"	0,398242749	"HLH"
"FOXG_10988"	0,39869295	"DUF1186 Amidohydro_3 Amidohydro_3"
"FOXG_16631"	0,398820093	dh_short DUF3726"
"FOXG_00969"	0,398844973	""
"FOXG_10089"	0,398980461	"ADH_N"
"FOXG_08692"	0,399514564	"MFS_1"
"FOXG_17692"	0,40033232	""
"FOXG_11585"	0,400648783	"MGC-24 Amnionless DUF4366 DUF1191 PspC HOK_GEF"
"FOXG_04450"	0,401054443	"DSBA"
"FOXG_04146"	0,4014466	"Glyco_hydro_11"
"GAOB" 0.401	0,747235059	
"FOXG_08754"	0,40255003	"Consortin_C SARAF PRIMA1 DAG1 RCR DUF4733"
"FOXG_09566"	0,404634153	"Dynein_heavy"
"FOXG_07646"	0,404841755	"CPSase_L_chain CPSase_L_D2 Biotin_carb_C AHS2 AHS1 Biotin_lipoyl"
"FOXG_03062"	0,404841755	""
"FOXG_11946"	0,405774469	""
"FOXG_12908"	0,405856043	""
"FOXG_13059"	0,406929281	"AMP-binding"

"FOXG_11722"	0,407067515	"IncA Baculo_p24 CAT DUF342 Fib_alpha Phasin Apolipoprotein
"FOXG_17535"	0,409220408	"EF-hand_5 RmID_sub_bind PAD"
"FOXG_17573"	0,409688698	""
"FOXG_01375"	0,411310555	"Aldedh DUF4491 Aldedh"
"FOXG_14853"	0,411781237	"adh_short"
"FOXG_02269"	0,412546887	"DUF4451 DUF4451"
"FOXG_11587"	0,412898763	""
"FOXG_04587"	0,413027572	"DHDPS"
"FOXG_07115"	0,413050476	""
"FOXG_15334"	0,413434303	"MMPL IncA"
"FOXG_16603"	0,414228867	"p450"
"FOXG_14497"	0,414518961	"Glyco_hydro_4 Glyco_hydro_4"
"FOXG_17488"	0,415681371	"FAA_hydrolase Hydrolase_4"
"FOXG_17410"	4,17741E+12	R_MLE_N MR_MLE_C"
"FOXG_17614"	0,417865339	"AAA H_kinase_N"
"FOXG_17217"	0,41815798	Amidase"
"FOXG_04405"	0,418520443	"Sugar_tr"
"FOXG_13164"	0,419583543	"GMC_oxred_N GMC_oxred_C"
"FOXG_13419"	0,419976352	"DUF3712"
"FOXG_11969"	0,420384097	"p450 SRI p450"
"FOXG_15801"	0,420809739	"Arrestin_C"
"FOXG_13497"	0,424206902	"FAD_binding_3 DUF2001 Phe_hydrox_dim"
"FOXG_17649"	4,24681E+13	Aldo_ket_red Aldo_ket_red"
"FOXG_16794"	0,42585081	"MFS_1"
"FOXG_17220"	0,426075204	"Aldedh"
"FOXG_14795"	0,427495163	"Methyltransf_3"
"FOXG_06359"	0,427640383	"Glyco_hydro_17"
"FOXG_13353"	0,427664097	"Alpha_L_fucos Fucosidase_C"
"FOXG_02554"	0,427871651	"
"FOXG_10673"	0,429571445	"Helo_like_N DUF2290"
"FOXG_03557"	0,431538147	"MFS_1"
"FOXG_17486"	0,431544129	"Pyr_redox_2 Sigma70_r3 RNase_H2-Ydr279"
"FOXG_11869"	0,432163759	"FAD_binding_3 Amidase"
"FOXG_10676"	0,435052074	"EcKinase"
"FOXG_17124"	0,436102752	"zf-C2H2 zf-C2H2"
"FOXG_08916"	0,436489847	"SnoaL_2 FlgD_ig"
"FOXG_12959"	0,436774338	""
"FOXG_08602"	0,437146878	"Cupin_1"
"FOXG_12371"	0,437374192	""
"FOXG_13767"	0,438223878	"adh_short CRISPR_Cas2"
"FOXG_05790"	0,440071546	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_04743"	0,440395002	"Fungal_trans"
"FOXG_03526"	0,441299495	"FAD_binding_3 FAD_binding_3"
"FOXG_01278"	0,441776934	"GMC_oxred_N GMC_oxred_C GMC_oxred_N GMC_oxred_C"
"FOXG_16873"	0,441783058	"adh_short"
"FOXG_16940"	0,442021975	"
"FOXG_11013"	0,442218106	CVNH"
"FOXG_05419"	0,44231927	""
"FOXG_13006"	0,442365261	"HAD_2"
"FOXG_02686"	0,442457258	"THF_DHG_CYH THF_DHG_CYH"
"FOXG_06363"	0,44457231	""
"FOXG_11983"	0,445432892	"ABC_membrane ABC_tran"
"FOXG_12954"	0,44557494	"NmrA Tubulin_2"
"FOXG_04523"	0,448851462	"Cupin_1"
"FOXG_15654"	0,449031948	""
"FOXG_01934"	0,449396253	Imm17"
"FOXG_01538"	0,449405598	"CpcD"
"FOXG_15660"	0,449598772	"DUF2730"
"FOXG_13396"	0,450047755	""
"FOXG_16490"	0,450765811	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_03720"	0,451278515	""
"FOXG_10212"	0,451519437	"adh_short"
"FOXG_17663"	0,452242976	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_16918"	0,452581651	"PALP"
"FOXG_07057"	0,453024192	"Sulfatase"
"FOXG_07376"	0,453184367	"ECH_1"
"FOXG_12391"	0,453338314	PP2C_2 Flagellin_N"

"FOXG_15356"	0,453533178	"TauD Ax_dynein_light TauD"
"FOXG_16568"	0,453800467	"AMP-binding AMP-binding_C"
"FOXG_11970"	0,454792384	"AMP-binding AMP-binding_C"
"FOXG_08316"	0,454927957	"Cu_bind_like"
"FOXG_16937"	0,455486437	"HET"
"FOXG_16484"	0,456757398	""
"FOXG_16824"	0,457533727	"MFS_1"
"FOXG_01626"	0,457847801	"ELFV_dehydrog_N ELFV_dehydrog ELFV_dehydrog_N ELFV_dehydrog"
"FOXG_11954"	0,459434149	"ketoacyl-synt Ketoacyl-synt_C KAsynt_C_assoc Acyl_transf_1 PS-DH Methyltransf_12"
"FOXG_04144"	0,459625262	"Sulfate_transp"
"FOXG_04982"	0,459908893	"DUF669"
"FOXG_12986"	0,460141665	"adh_short"
"FOXG_07149"	0,461374444	"zf-MYND"
"FOXG_12907"	0,462479076	"Glyco_hydro_43"
"FOXG_12200"	0,462543194	"Fungal_trans_2"
"FOXG_09844"	0,463400016	"FAD_binding_4 FAD_binding_4 BBE"
"FOXG_13102"	0,463775978	"GAD"
"FOXG_17153"	0,463820985	"Amidohydro_1"
"FOXG_13554"	0,464033221	""
"FOXG_12983"	0,464451546	""
"FOXG_12768"	0,464931474	"dCMP_cyt_deam_1"
"FOXG_08543"	0,464944365	"Acetyltransf_1"
"FOXG_15745"	0,465253852	"ATP-grasp_2 MoeA_C Ligase_CoA"
"FOXG_04677"	0,46557968	""
"FOXG_00528"	0,465670049	"Ala_racemase_N Ala_racemase_N"
"FOXG_10900"	0,465896049	"GST_N GST_C"
"FOXG_05962"	0,466383935	"MFS_1 Spore_III_AF"
"FOXG_09924"	0,466843208	""
"FOXG_13631"	0,467176626	"adh_short"
"FOXG_14663"	0,46749408	"Methyltransf_23"
"FOXG_05214"	0,467672337	"Asp TAA-Trp-ring"
"FOXG_15833"	0,467934985	"Amidohydro_2"
"FOXG_13517"	0,468080964	"Fungal_trans_2"
"FOXG_09669"	0,468450982	Zn_clus Zn_clus"
"FOXG_00219"	0,468476959	"LamB_YcsF"
"FOXG_07644"	0,468691326	"MmgE_Prpd MmgE_Prpd PsbU"
"FOXG_10959"	0,470158791	""
"FOXG_16569"	0,470237011	"Fungal_trans_2"
"FOXG_15208"	0,470654404	""
"FOXG_11143"	0,470974221	"HSP20 HSP20"
"FOXG_14921"	0,471624313	"Acyl_transf_3"
"FOXG_05446"	0,472370246	"GGACT GGACT"
"FOXG_01524"	0,472973087	"DUF4700"
"FOXG_13125"	0,473055054	"Fungal_trans_2 DUF86"
"FOXG_05806"	0,474352021	"HeLo Pkinase HeLo"
"FOXG_15267"	0,474680931	"adh_short"
"FOXG_17570"	0,474707254	"Cofilin_ADF SpoVR GBS_Bsp-like"
"FOXG_03532"	0,474980437	"Amidase lcmF-related Amidase"
"FOXG_17434"	0,475840509	"Zn_clus Fungal_trans"
"FOXG_11463"	0,475886687	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_11929"	0,477052517	"DUF4246 2OG-Fell_Oxy_3"
"FOXG_17023"	0,478201314	""
"FOXG_10488"	0,478343865	"Methyltransf_23"
"FOXG_15887"	0,480081085	"NACHT Ank_2"
"ODX1" 0.481	0,377294566	"Ammonium_transp Glucan_synthase Ammonium_transp"
"FOXG_13552"	0,481570859	""
"FOXG_00527"	0,481781199	"THOC7 PWWP"
"FOXG_11899"	0,482015017	"Amidase"
"FOXG_10029"	0,482078502	"MIT"
"FOXG_13257"	0,482837623	""
"FOXG_04653"	0,483661632	"Hamartin"
"FOXG_13698"	0,483718627	"Fungal_trans"
"FOXG_11399"	0,484111074	""
"FOXG_13066"	0,484151342	"AJAP1_PANP_C Podoplanin"
"FOXG_02247"	0,484607958	"His_Phos_1"
"FOXG_13587"	0,485997231	
"FOXG_10140"	0,486297136	

"FOXG_12667"	0,487157439	"Baculo_PEP_C"
"FOXG_11508"	0,487363462	Presenilin Nop14"
"FOXG_10098"	0,487518881	"Asp"
"FOXG_12381"	0,487711535	"Metallophos"
"FOXG_05765"	0,487897501	"zf-C3HC4_5 DUF3797 MAT1 MRP-S26"
"FOXG_15700"	0,4882798	"Glyco_hydro_88"
"FOXG_17340"	0,489754278	"B12-binding"
"FOXG_02047"	4,90478E+13	MFS_1 MFS_1"
"FOXG_07146"	0,490491486	""
"FOXG_09650"	0,491386456	""
"FOXG_11046"	0,492085189	"TauD"
"FOXG_06411"	0,492409329	"
"FOXG_01500"	0,492993319	"
"FOXG_12685"	0,493663539	""
"FOXG_17189"	0,493663539	"ADH_zinc_N_2"
"FOXG_17128"	0,494026385	"SRP-alpha_N"
"FOXG_13364"	0,494972404	"MMR_HSR1"
"FOXG_09923"	0,495435791	""
"FOXG_13342"	0,4966323	"MFS_1 DUF2583 TetR_N"
"FOXG_13653"	0,496714924	"ABC_trans_N ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR ABC_tran
"FOXG_17029"	0,497424682	"ADH_N ADH_zinc_N"
"FOXG_16428"	0,497880011	""
"FOXG_04773"	0,49942848	"MFS_1"
"FOXG_13010"	0,499601599	"VapB_antitoxin FAD_binding_4 BBE"
"FOXG_15261"	0,499993069	"Abhydrolase_6 Abhydrolase_6"

Anexo II. Tabla C5.1. Valor estadístico de las comparaciones de las marcas epigenéticas entre los distintos genes en la oscuridad para cada una de las estirpes investigadas. Se indican los valores p del análisis estadístico *t-Student*..

Silvestre						$\Delta carP$					
H3K4me3	<i>carB</i>	<i>carS</i>	<i>carP</i>	<i>tub-6</i>	<i>Foxg_05571</i>	H3K4me3	<i>carB</i>	<i>carS</i>	<i>carP</i>	<i>tub-6</i>	<i>Foxg_05571</i>
<i>carRA</i>	0,4099	0,0040	0,0015	0,0083	0,0346	<i>carRA</i>	0,8429	<0,0001	0,0109	0,0051	0,2170
<i>carB</i>		0,0033	0,0010	0,0071	0,0131	<i>carB</i>		<0,0001	0,0109	0,0051	0,2100
<i>carS</i>			0,6799	0,3666	0,0148	<i>carS</i>			0,0014	0,0115	<0,0001
<i>carP</i>				0,2248	0,0078	<i>carP</i>				0,1682	0,0307
<i>tub-6</i>					0,0180	<i>tub-6</i>					0,0101
H3K9ac						H3K9ac					
<i>carRA</i>	0,9431	0,1205	0,2565	0,7752	0,6460	<i>carRA</i>	0,8526	0,0225	0,2670	0,1703	0,8960
<i>carB</i>		0,1051	0,2260	0,7353	0,6884	<i>carB</i>		0,0360	0,3354	0,2423	0,8022
<i>carS</i>			0,5877	0,3012	0,0598	<i>carS</i>			0,2674	0,2180	0,0374
<i>carP</i>				0,5310	0,1281	<i>carP</i>				0,9762	0,2901
<i>tub-6</i>					0,5533	<i>tub-6</i>					0,2130
H3K9me3						H3K9me3					
<i>carRA</i>	0,6457	0,3032	0,2527	0,2366	0,2826	<i>carRA</i>	0,9461	0,2872	0,1875	0,1995	0,1199
<i>carB</i>		0,3411	0,2401	0,2147	0,2147	<i>carB</i>		0,1793	0,0900	0,9988	0,1008
<i>carS</i>			0,5129	0,3990	0,1163	<i>carS</i>			0,3326	0,4259	0,0493
<i>carP</i>				0,6754	0,1064	<i>carP</i>				0,7411	0,0412
<i>tub-6</i>					0,1029	<i>tub-6</i>					0,0422

SX1						SX2					
H3K4me3	<i>carB</i>	<i>carS</i>	<i>carP</i>	<i>tub-6</i>	<i>Foxg_05571</i>	H3K4me3	<i>carB</i>	<i>carS</i>	<i>carP</i>	<i>tub-6</i>	<i>Foxg_05571</i>
<i>carRA</i>	0,4853	0,0083	0,0270	0,0100	0,4699	<i>carRA</i>	0,4466	0,0042	0,0042	0,1026	0,0733
<i>carB</i>		0,0055	0,0172	0,0080	0,2576	<i>carB</i>		0,0035	0,0033	0,0946	0,0378
<i>carS</i>			0,4922	0,1027	0,1546	<i>carS</i>			0,6271	0,6340	0,0126
<i>carP</i>				0,1366	0,0722	<i>carP</i>				0,5055	0,0158
<i>tub-6</i>					0,0169	<i>tub-6</i>					0,1474
H3K9ac						H3K9ac					
<i>carRA</i>	0,8433	0,8039	0,5168	0,6027	0,2136	<i>carRA</i>	0,8165	0,7001	0,8057	0,3769	0,1966
<i>carB</i>		0,9924	0,3679	0,4422	0,1215	<i>carB</i>		0,8952	0,6570	0,3269	0,1944
<i>carS</i>			0,2385	0,3133	0,0259	<i>carS</i>			0,574	0,2548	0,1396
<i>carP</i>				0,8763	0,4624	<i>carP</i>				0,5078	0,2880
<i>tub-6</i>					0,3664	<i>tub-6</i>					0,7588
H3K9me3						H3K9me3					
<i>carRA</i>	0,6944	0,1049	0,0098	0,0006	0,0001	<i>carRA</i>	0,2995	0,0038	0,2792	0,0197	0,0005
<i>carB</i>		0,0772	0,0085	0,0007	0,0002	<i>carB</i>		0,0168	0,6328	0,0667	0,0004
<i>carS</i>			0,4468	0,0511	0,0001	<i>carS</i>			0,2348	0,9080	0,0002
<i>carP</i>				0,0691	<0,0001	<i>carP</i>				0,3215	0,0005
<i>tub-6</i>					<0,0001	<i>tub-6</i>					0,0003

Anexo II. Tablas C5.2. Valor estadístico de las comparaciones de las marcas epigenéticas entre las distintas estirpes en la oscuridad para cada uno de los genes analizados. Se indican los valores p del análisis estadístico T-Student..

<i>carRA</i>			
H3K4me3	$\Delta carP$	SX1	SX2
Silvestre	0,1707	0,6963	0,2340
		0,3876	0,8395
			0,3555
H3K9ac			
Silvestre	0,4148	0,1872	0,5169
		0,1720	0,2653
			0,3355
H3K9me3			
Silvestre	0,5678	0,3110	0,3416
		0,3619	0,4549
			0,6049

<i>carB</i>			
H3K4me3	$\Delta carP$	SX1	SX2
Silvestre	0,4009	0,9239	0,2212
		0,4214	0,6411
			0,2357
H3K9ac			
Silvestre	0,5289	0,0974	0,4036
		0,1086	0,3025
			0,2999
H3K9me3			
Silvestre	0,7437	0,4652	0,3369
		0,4616	0,2199
			0,1196

<i>carS</i>			
H3K4me3	$\Delta carP$	SX1	SX2
Silvestre	0,0053	0,1910	0,7738
		0,2685	0,0036
			0,1435
H3K9ac			
Silvestre	0,8272	0,2467	0,7165
		0,1771	0,8503
			0,1895
H3K9me3			
Silvestre	0,5808	0,7859	0,2659
		0,6013	0,4816
			0,1413

<i>carP</i>			
H3K4me3	$\Delta carP$	SX1	SX2
Silvestre	0,4980	0,4291	0,6386
		0,3269	0,8484
			0,3137
H3K9ac			
Silvestre	0,4950	0,9356	0,5250
		0,6056	0,9840
			0,5889
H3K9me3			
Silvestre	0,1505	0,9226	0,5838
		0,1068	0,1928
			0,5277

<i>tub-6</i>			
H3K4me3	$\Delta carP$	SX1	SX2
Silvestre	0,6578	0,1847	0,8632
		0,1541	0,9284
			0,2337
H3K9ac			
Silvestre	0,9602	0,4793	0,5718
		0,5029	0,4722
			0,2434
H3K9me3			
Silvestre	0,6526	0,4007	0,8673
		0,5573	0,7259
			0,4260

<i>Foxg_05571</i>			
H3K4me3	$\Delta carP$	SX1	SX2
Silvestre	0,2174	0,9015	0,3066
		0,5290	0,7061
			0,5720
H3K9ac			
Silvestre	0,6012	0,5370	0,5492
		0,3631	0,9515
			0,3002
H3K9me3			
Silvestre	0,5457	0,5744	0,3898
		0,6153	0,7162
			0,1204

Anexo II. Tabla C5.3 Valor estadístico de las comparaciones de las marcas epigenéticas entre luz y oscuridad para los distintos genes y estirpes investigadas. Se indican los valores p del análisis estadístico *t-Student*..

H3K4me3			H3K9ac			H3K9me3		
Gen	Estirpe	Valor p.	Gen	Estirpe	Valor p.	Gen	Estirpe	Valor p.
<i>carRA</i>	Silvestre	0,7534	<i>carRA</i>	Silvestre	0,4978	<i>carRA</i>	Silvestre	0,9980
	$\Delta carP$	0,4327		$\Delta carP$	0,3526		$\Delta carP$	0,2624
	SX1	0,8072		SX1	0,3470		SX1	0,8821
	SX2	0,4497		SX2	0,1922		SX2	0,1271
<i>carB</i>	Silvestre	0,4567	<i>carB</i>	Silvestre	0,2928	<i>carB</i>	Silvestre	0,5844
	$\Delta carP$	0,5003		$\Delta carP$	0,4558		$\Delta carP$	0,3380
	SX1	0,5002		SX1	0,3566		SX1	0,9589
	SX2	0,3539		SX2	0,3479		SX2	0,1149
<i>carS</i>	Silvestre	0,4862	<i>carS</i>	Silvestre	0,5858	<i>carS</i>	Silvestre	0,9687
	$\Delta carP$	0,3096		$\Delta carP$	0,5462		$\Delta carP$	0,4855
	SX1	0,8800		SX1	0,3654		SX1	0,6882
	SX2	0,2042		SX2	0,3067		SX2	0,1414
<i>carP</i>	Silvestre	0,6042	<i>carP</i>	Silvestre	0,7444	<i>carP</i>	Silvestre	0,7683
	$\Delta carP$	0,4375		$\Delta carP$	0,5179		$\Delta carP$	0,3494
	SX1	0,7026		SX1	0,4004		SX1	0,2395
	SX2	0,7495		SX2	0,5558		SX2	0,9031
<i>tub-6</i>	Silvestre	0,79949	<i>tub-6</i>	Silvestre	0,7395	<i>tub-6</i>	Silvestre	0,9749
	$\Delta carP$	0,4792		$\Delta carP$	0,5580		$\Delta carP$	0,5676
	SX1	0,5017		SX1	0,6351		SX1	0,2031
	SX2	0,3292		SX2	0,6886		SX2	0,8184
<i>Foxg_05571</i>	Silvestre	0,6973	<i>Foxg_05571</i>	Silvestre	0,7352	<i>Foxg_05571</i>	Silvestre	0,7665
	$\Delta carP$	0,4769		$\Delta carP$	0,5276		$\Delta carP$	0,1471
	SX1	0,6695		SX1	0,5001		SX1	0,1083
	SX2	0,2775		SX2	0,7554		SX2	0,0772